

ZUR PRIMÄRSTRUKTUR DER
CYTOPLASMATISCHEN GLYCERIN-3-
PHOSPHAT-DEHYDROGENASE AUS
DEM SKELETMUSKEL DES
KANINCHENS

ISOLIERUNG UND SEQUENZIERUNG VON
BROMCYANPEPTIDEN

Günther Ludwig Rückl

1981

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Aus dem Institut für
Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie
der Universität München

Vorstände: Prof. Dr.Dr. Th. Bücher, Prof. Dr. E. M. Klingenberg, Prof. Dr. F. Miller, Prof. Dr. H. G. Zachau

ZUR PRIMÄRSTRUKTUR
DER CYTOPLASMATISCHEN GLYCERIN-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE
AUS DEM SKELETMUSKEL DES KANINCHENS:
ISOLIERUNG UND SEQUENZIERUNG VON BROMCYANPEPTIDEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günther Ludwig Rückl
aus Plattling

München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter

Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Dekan

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung

12. 2. 1981



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1973 bis November 1977 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c. Theodor Bücher und Herrn Dr. rer. nat. Elmar Wachter.

Herrn Professor Bücher danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Von Herzen danke ich meiner lieben Freundin, Karen McKnight, für die Opferbereitschaft, Geduld, Solidarität und das Verständnis, mit der sie mich während der Entstehung der Arbeit über alle Höhen und Tiefen begleitet hat.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Elmar Wachter für die stete und tatkräftige Unterstützung bei der theoretischen und praktischen Bewältigung fachlicher Problemstellungen, sowie für Peptidsequenzierungen am Festphasensequenator. Vor allem möchte ich ihm für das einfühlsame Verständnis danken, das er meinem starken Bedürfnis nach Bewegungsfreiheit im selbständigen Experimentieren entgegenbrachte. An die bestimmte, aber von unverkennbarem Wohlwollen geprägte Art, mit der er meinen Tendenzen zur experimentellen Übertreibung entgegentrat, werde ich mich gerne und dauernd erinnern.

Nicht minder zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Diplomchemiker Robert Werhahn, dessen Ausgeglichenheit, faire Gesinnung und erfrischender Humor als stabilisierende Elemente im Laborleben ich überaus schätzte; dank ihm wurde so manche Woge emotionalen Aufruhrs in mir geglättet.

Herrn Privatdozent Dr. med. Werner Machleidt möchte ich für die wertvolle Hilfestellung zur Zeit meiner ersten Schritte auf dem Parkett der Proteinchemie danken, insbesondere für sein Verdienst, bleibende Begeisterung für das Fach in mir geweckt und meinen Sinn für die gezielte Anwendung technischer Möglichkeiten zur apparativen Optimierung von Arbeitsmethoden geschärft zu haben.

Herrn Ing. Helmut Hofner und der Werkstatt des Instituts danke ich für die gute Kooperation und ihren Einsatz bei der in souveräner Kompetenz und beispielhafter Findigkeit erreichten Bewältigung technischer Probleme.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfram Zillig bedanke ich mich für die Unterstützung meiner Arbeit durch Gewährung einer technischen Assistenz in der Person von Frau Gabriele Schreiber, die mir in der Endphase der Untersuchungen durch ihre geschickte und zuverlässige Mitarbeit eine große Hilfe war.

Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Wolfgang Krietsch bin ich für die mehrmalige, kritische Durchsicht meiner Einleitung zu Dank verpflichtet.

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSÜBERSICHT

A. EINLEITUNG	1
1. Die cytoplasmatische L- α -Glycerophosphat-Dehydrogenase (α GPDH)	1
1.1. Katalysierte Reaktion	2
1.2. Vorkommen	2
1.3. Verteilung in Säugergeweben	3
1.4. Funktionen und Beziehungen der α GPDH im Zellstoffwechsel	6
1.4.1. Die α GPDH im Stoffwechsel des Glycerins	6
1.4.2. Die α GPDH im Stoffwechsel des Wasserstoffs	12
1.5. Isoenzyme	20
1.6. Genetische Repräsentation	27
2. Raumstruktur Pyridinnucleotid-abhängiger Dehydrogenasen	31
B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	42
1. Untersuchung der Reinheit und Integrität der α GPDH in kommerziellen Präparaten	42
2. Untersuchungen zur Säurestabilität modifizierter und unmodifizierter α GPDH	47
3. Modifizierung der Cysteine mit Jodessigsäure oder Aziridin	48
4. Bromcyanspaltung der alkylierten α GPDH und Auftrennung der Fragmente	51
5. Isolierung und Sequenzierung einzelner Bromcyanpeptide	56
5.1. Grobe Charakterisierung der Hauptfraktion A	56
5.2. Grobe Charakterisierung der Hauptfraktion B	56
5.3. Isolierung und Sequenzierung der Bromcyanpeptide E ₂ und E ₃	59
5.3.1. Isolierung von E ₂ und E ₃	59
5.3.2. Sequenzierung von E ₂ und E ₃	61
5.4. Isolierung und Sequenzierung des acidolytischen Spaltprodukts E ₁	64
5.4.1. Isolierung von E ₁	64
5.4.2. Sequenzierung von E ₁	67
5.5. Isolierung und Sequenzierung des Bromcyanpeptids D ₂	68
5.5.1. Isolierung von D ₂	68
5.5.2. Sequenzierung von D ₂	71
5.5.3. Enzymatische Spaltung trägerfixierter Peptide	73

5.6.	Isolierung und Sequenzierung der Bromcyan-peptide D ₁ /I und D ₁ /II	87
5.6.1.	Isolierung von D ₁ /I und D ₁ /II	87
5.6.2.	Sequenzierung von D ₁ /I	92
5.6.3.	Sequenzierung von D ₁ /II	95
5.7.	Isolierung und Sequenzierung des Bromcyan-peptids C	96
5.7.1.	Isolierung von C	96
5.7.2.	Sequenzierung von C	100
5.8.	Isolierung und Teilsequenzierung des Brom-cyanpeptids prä-A	109
5.8.1.	Isolierung von prä-A	109
5.8.2.	Teilsequenzierung von prä-A	113
6.	Isolierung und Charakterisierung des N-terminalen Fragments NT des acidolytisch gespaltenen N-terminalen Bromcyanpeptids NT-E ₁	120
7.	Isolierung, Charakterisierung und Teilsequenzierung analytischer Mengen von Überlappungs-peptiden	124
7.1.	Gesicherte Überlappungen	124
7.2.	Postulierte Überlappungen	129
8.	Sekundärstruktur der αGPDH	132

C. EXPERIMENTELLER TEIL

1.	Material	144
1.1.	αGPDH-Präparat	144
1.2.	Chemikalien	144
2.	Methoden	147
2.1.	Analytische Methoden	147
2.1.1.	Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese	147
2.1.2.	Acetylcellulose-Harnstoff-Elektrophorese	147
2.1.3.	Acetylcellulose-Elektrophorese	148
2.1.4.	Analytische Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel	149
2.1.5.	Aminosäureanalysen	150
2.1.6.	Analytische Gelchromatographie	150
2.1.7.	Bestimmung der Cysteine mit DTNB	151
2.1.8.	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren mit der Dansyltechnik	151
2.1.9.	Bestimmung der Aminosäuresequenz durch automatisierten Edman-Abbau von Peptiden an der Festphase	152
2.1.9.1.	Kopplung der Peptide an die Festphase	152
2.1.9.1.1.	Homoserinlacton-Kopplung	152
2.1.9.1.2.	DITC-Kopplung	153
2.1.9.1.3.	C-terminale Kopplung	153
2.1.9.2.	Sequentieller Abbau am Festphasen-Sequenator	153
2.1.9.3.	Identifizierung der Pth-Aminosäuren	154

III

2.1. 9.3.1.	Gaschromatographische Identifizierung	154
2.1. 9.3.2.	Massenspektrometrische Identifizierung	155
2.1. 9.3.3.	Identifizierung durch Aminosäurenana- lyse	156
2.1.10.	Bestimmung der Aminosäuresequenz durch manuellen Abbau nach der Dansyl-Edman- Technik	156
2.1.11.	Bestimmung der Aminosäuresequenz durch manuellen Edman-Abbau unter Verwendung von DABITC mit direkter Identifizierung der Dabth-Aminosäuren	157
2.1.12.	UV-Spektrophotometrie	159
2.1.13.	Radioaktivitätsmessung	159
2.2.	Präparative Methoden	159
2.2. 1.	Gelfiltration von Peptiden	159
2.2. 2.	Ionenaustauschchromatographie	162
2.2. 3.	Reduktion niederer Oxidationsstufen von Cystein und Methionin mit DTE bzw. NaBH_4	163
2.2. 4.	Umsetzung der Cysteine mit Aziridin	163
2.2. 5.	Umsetzung der Cysteine mit Jodessigsäure	164
2.2. 6.	Spaltung der Methionylbindungen mit Brom- cyan	164
2.2. 7.	Umsetzung der Lysine mit Citraconsäure- anhydrid	165
2.2. 8.	Umsetzung von Aminogruppen mit 4-Sulfo- phenylisothiocyanat	166
2.2. 9.	Umsetzung von Aminogruppen mit Di-tert.- butyldicarbonat	166
2.2.10.	Umsetzung von Aminogruppen mit 1-Guanyl- 3,5-dimethylpyrazolnitrat	167
2.2.11.	Spaltung mit Trypsin bzw. Chymotrypsin	167
2.2.12.	Totalhydrolyse mit Pronase P und Amino- peptidase M	169
2.2.13.	Partialhydrolyse mit Carboxypeptidase A	169
D. ZUSAMMENFASSUNG		170
E. LITERATURVERZEICHNIS		172
F. ABKÜRZUNGEN		196

EINLEITUNG

Zunächst möchte ich das Enzym vorstellen, welches im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchung steht: die NAD-abhängige α -Glycerophosphat-Dehydrogenase des Cytoplasmas (α GPDH).

Auf seine Verteilung in den Geweben, seine wichtigsten bekannten Funktionen und Beziehungen im Zellstoffwechsel, sein Auftreten in verschiedenen molekularen Formen und deren genetische Repräsentation wird näher eingegangen (1.).

Dann werfen wir einen Blick auf die räumliche Organisation Pyridinnucleotid-bindender Dehydrogenasen, zu denen die α GPDH hinsichtlich der Natur ihres Coenzyms zählt. Gemeinsame Strukturelemente, fast ausnahmslos in der hochgradig konservierten Kettenfaltung der Dinucleotid-bindenden Domäne anzutreffen, werden aufgezeigt. Mit der Skizzierung eines interessanten, auf Sequenzvergleichen basierenden Versuchs der Rekonstruktion von Urformen dieser Bindungsregion (G.W.R. Walker, 1978) endet ein kurzer Ausflug in die Evolution NAD-abhängiger Dehydrogenasen (2.).

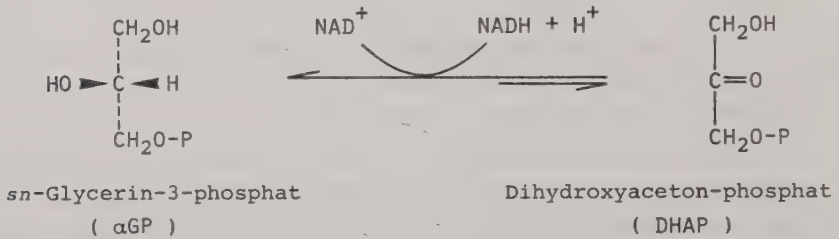
1. Die cytoplasmatische L- α -Glycerophosphat-Dehydrogenase (*sn*-Glycerin-3-phosphat : NAD⁺ 2 - Oxidoreductase) EC 1.1.1.8. ; v. EULER - BARANOWSKI - Enzym

Das Enzym wurde 1936 von v. Euler und Mitarbeitern in Extrakten verschiedener tierischer Gewebe entdeckt [1,2] und 1948 von Baranowski aus dem Skelettmuskel des Kaninchens erstmals isoliert und in kristalliner Form dargestellt [3].

Es ist ein Dimer [4], bestehend aus zwei chemisch identischen, N-terminal acetylierten Untereinheiten [4] mit je 348 Aminosäureresten [5]. Das Molekulargewicht einer Untereinheit beträgt 37 500 [5]. Das native Enzym bindet spezifisch zwei Moleküle NAD(H) [6]. Die Natur einer weiteren, bei 260 nm absorbierenden Nicht-Protein-Komponente ist ungeklärt [7,Ref. in 8].

1.1. Katalysierte Reaktion

Die α GPDH katalysiert im extramitochondrialen Raum des Cytoplasmas [9,10] die für das Coenzym NAD(H) [1] B-stereospezifische [11] Reaktion:



$K = 4,6 \times 10^{-12} \text{ M}$	(pH 7; 25°C; I $\rightarrow$ 0 M) [12]; [2,3]
$\Delta G^{\circ'} = 42,8 \text{ kJ Mol}^{-1}$	(pH 7; 25°C; I $\rightarrow$ 0 M) [12]
$E^{\circ'} = -0,192 \text{ V}$	(pH 7) [12]

1.2. Vorkommen

α GPDH-Aktivität wurde in einer großen Zahl von Metazoen und in einer Reihe von Protozoen und Mycophyten festgestellt.

Das Enzym wurde aus folgenden Organismen isoliert und charakterisiert: *Kaninchen* [3], *Ratte* [13], *Maus* [14], *Mensch* [15], *Rind* [16], *Huhn* [17], Biene *Apis mellifera* [18], *Wespe Vespa vulgaris* [19], *Hummel Bombus nevadensis* [20], Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [21], Fruchtfliege des Mittelmeerraumes *Ceratitis capitata* [22], Trypanosomatiden *Crithidia fasciculata* [23] und eine *Leptomonas*-Species (ATCC 30250) [24]. Siehe Isoenzyme S.20, und [131,132 u.Ref.].

Die Isolierung einer α GPDH aus Pflanzen steht noch aus. In der Literatur wird sie uneinheitlich als NAD- bzw. NADP-abhängiges Enzym angegeben [25,26].

Die Existenz einer bakteriellen Pyridinnucleotid-abhängigen Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase ist gesichert:

Das NAD(P)-abhängige Enzym (EC 1.1.1.94 [27]*) wurde aus dem Zellsaft verschiedener *Escherichia coli*-Stämme isoliert [28, 29] und eingehend charakterisiert [30]. Im Gegensatz zur α GPDH der Säuger, die mit NADPH nur einen Bruchteil der mit NADH gezeigten Aktivität erreicht [31], ist die bakterielle Dehydrogenase mit dem phosphorylierten Coenzym wirksamer [28]. Eine ihrer wichtigsten Stoffwechselfunktionen besteht darin, die bei Abwesenheit exogenen Glycerins oder α GP fehlende Ausgangsverbindung der Phospholipid-Biosynthese durch Reduktion endogenen DHAP zu ersetzen [32-34]. Mutanten mit einem Defekt im Strukturgen der "biosynthetischen" α -Glycerophosphat-Dehydrogenase [28] sind auxotroph für Glycerin [35] oder α GP [36]. Das Gen, *gpsA*, wurde auf dem Chromosom bei 71,5 Minuten kartiert [37]. Das native Enzym ist, wie alle derzeit bekannten α GPDHs, aus zwei, wahrscheinlich identischen Untereinheiten aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 50000-65000 [29] bzw., nach anderen Autoren, 65000-80000 [38]. Differenzen zu bekannten Proto- und Metazoen- α GPDHs ergeben sich bisher, vom möglicherweise geringeren Molekulargewicht abgesehen, in kinetischen Eigenschaften [30] und, am deutlichsten, in der Aminosäurezusammensetzung [29] (S. 50).

Neben der löslichen, NAD(P)-abhängigen α -Glycerophosphat-Dehydrogenase wurden in *E.coli* zwei weitere identifiziert: eine anaerobe, die in einem Enzymkomplex integriert ist, und eine aerobe, die membrangebunden und zur mitochondrialen α -Glycerophosphat-Dehydrogenase funktionsanalog ist. Beide benützen ein Flavinnucleotid als Wasserstoffakzeptor [33].

* auch in der jüngeren Literatur häufig unkorrekt mit EC 1.1.1.8. klassifiziert (z.B. [29]).

1.3. Verteilung der α GPDH in Säugergeweben

Mangels entsprechender Untersuchungen am Kaninchen, dem Objekt dieser Untersuchung, wird in der folgenden Zusammenstellung (Tab. 1) die Verteilung der α GPDH in Organen der Ratte wiedergegeben. Sie dürfte jedoch, bei der nahen phylogenetischen Verwandtschaft der beiden Nager, auch die Verhältnisse im Kanin-

chen treffen [39], und darüberhinaus, in der Größenordnung zumindest, für den Menschen [40a,41-45] und die übrigen Säuger Gültigkeit haben.

	[9]	[39]	[46]	
Leber	100	100	100	Die Zahlen stellen relative Aktivitäten dar.
Skelettmuskel	54	75	47	
Niere		38	37	Bezugsgröße ist die α GPDH-Aktivität der Leber (=100).
Herzmuskel	15	17	15	
Gehirn	5	12	6	Die absoluten Aktivitäten waren auf das Organ-Frischgewicht bezogen.
Fettgewebe		5		

Tabelle 1 Aktivitätsverteilung der α GPDH in Organen der Ratte

Die Tabelle zeigt eine Auswahl von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen. Sie wurde nach dem Gesichtspunkt der besten Übereinstimmung getroffen. Insgesamt variieren die absoluten Gewebsgrößen von Autor zu Autor beträchtlich.

Zahlenmäßig unbedeutende α GPDH-Aktivitäten (<5 , rel. zur Leber =100) wurden in der glatten Muskulatur [47], Milz [39,45], Lunge [41-43,45], im Pankreas [41] und im Magen-Darm- und Urogenitaltrakt gemessen [41,42,44,47], extrem niedrige bzw. keine im lymphatischen Gewebe [41,42], in Reticulocyten, kernlosen und kernhaltigen Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten [49, 50], Zellen in Kultur [51] und in vielen, vor allem schnell wachsenden spontanen und experimentellen Tumoren [9,10,41,42, 44,48,52,53,54].

Bemerkenswert ist der Befund, daß die Aktivität der α GPDH in quergestreifter Muskulatur visceraler Herkunft gegenüber jener somatischer Herkunft erheblich vermindert ist [47] (Tab. 2). Für die Enzyme des Kohlenhydrat-Stoffwechsels ergeben sich ähnliche Verhältnisse. Gleich oder erhöht hingegen sind die Aktivitäten der Enzyme des Citrat-Zyklus. Diese Beobachtungen erlauben nicht nur Rückschlüsse auf die Stoffwechselleistung der einzelnen Muskelgewebe, sie machen auch deutlich, daß die Enzymspektren verschiedener Muskeltypen weniger Ausdruck ihrer histologischen Struktur (quergestreift - glatt) und der Art ihrer Kontrolle (willkürlich - autonom) zu sein scheinen, sondern

eher Spiegelbild einer komplexen Überlagerung von ontogenetischem Ursprung (visceral/splanchnopleural - somatisch/somitisch [55]), nervöser Versorgung (Spinalnerven - Branchialnerven), Spezialisierung (tetanisch - tonisch) und funktioneller Anpassung.

Beinmuskel (m. quadriceps)	s Q	100	Die Zahlen stellen relative Aktivitäten dar. Bezugsgröße ist die α GPDH-Aktivität des Beinmuskels (=100).
Ventrolateraler Bauchmuskel	s Q	88	
Kaumuskel (m. masseter)	v Q	49	Die absoluten Aktivitäten waren auf das Organ-Frischgewicht bezogen. Muskel s = somatischer Herkunft v = visceraler "
Herzmuskel	v Q	20	
Oesophagus	v Q	16	Q = mit Querstreifung G = ohne "
Magenmuskel (Pfeiler d. Pansen)	v G	1,5	
Uterus	v G	0,5	

Tabelle 2 Aktivitätsverteilung der α GPDH in Muskeln somatischer und visceraler Herkunft (Rind, bei der Ratte vergleichbare Relationen) [47].

Empfindlicher Indikator einer Zellschädigung mit Einbeziehung des Plasmalemmes ist ein Anstieg enzymatischer Aktivitäten im Blut. Art und Menge der freigesetzten, zellulären Enzyme geben einen Hinweis auf Ort und Schwere der Läsion. Ist sie geringfügig, wird man in der Regel nur eine Aktivitätserhöhung extramitochondrialer Enzyme feststellen. Ist sie tiefgreifend und führt zur Zellnekrose, treten auch mitochondrial lokalisierte Enzyme im Blut auf. Mit einer unterschiedlichen Aktivitätsverteilung in den Organen, der Maximalaktivität in der Leber und der Lokalisation im extramitochondrialen Raum erfüllt die α GPDH drei wesentliche Kriterien, die sie als Testenzym zur Differentialdiagnose und Verlaufskontrolle von Lebererkrankungen empfehlen [40a-f, 41, 56]. Bereits in der Frühzeit der Enzymdiagnostik konnte sich allerdings, vorwiegend auf Grund ihrer höheren absoluten Aktivität in der Leber und einigen anderen Organen, die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, EC 2.6.1.2.) gegenüber der α GPDH in der klinischen Leberdiagnostik durchsetzen [40c, 41, 57].

1.4. Funktionen und Beziehungen der α GPDH im Zellstoffwechsel

Formal stellt die α GPDH eine Verbindung her zwischen Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus.

Spezifische Funktionen ergeben sich für sie in der Zelle im

- Stoffwechsel des Glycerins,
wenn stoffliche Transformation im Vordergrund steht
(Lipidsynthese; Gluconeogenese), sowie im
- Stoffwechsel des Wasserstoffs,
wenn energetische Transformation Schwerpunkt ist
(Stabilisierung des cytoplasmatischen NAD^+ -Spiegels; α -Glycerophosphat-Zyklus).

Welches Potential, einzeln oder in Kombination, realisiert wird, hängt von der Art der Zelle, ihrem Differenzierungsgrad und der Stoffwechsellage ab.

1.4.1. Die α GPDH im Stoffwechsel des Glycerins

In Bakterien [33,34,58], niederen pflanzlichen und tierischen Organismen [26,59] und in höheren Pflanzen und Tieren [26,60] wird unter bestimmten regulativen Voraussetzungen [26,34,59,60, 61a,62a,63a,64] DHAP durch die Wirkung der α GPDH zu α GP reduziert. Dieses fließt als Ausgangssubstanz der Biosynthese von Acylglycerinen, Glycerophospho-, Glyceroglyco- und Glycerosulfolipiden in den Lipidstoffwechsel ein, aus dem es mittelbar, nach Phosphorylierung von Glycerin, bei Lipolyse anfällt [62b-c,63b-c].

Acylglycerine sind energiereiche Speicherfette, welche man in hohen Konzentrationen in Sporen von Protophyten, in Pflanzensamen und im Fettgewebe von Tieren findet. Letzteres dient nicht nur als Energiereservoir; es polstert Knochen, Organe, größere Blutgefäße und Nerven, isoliert gegen Hitze und Kälte und leistet einen nicht unerheblichen Beitrag zur Ästhetik von Körperformen. Glycerophospho- und Glyceroglycolipide sind Bausteine aller biologischen Membranen; Glycerosulfolipide wurden bisher nur in Chloroplastenmembranen und im Hodengewebe nachge-

wiesen [26,34,58-60,61b,62b-d,63b-d,65]. Nicht in Strukturen integrierte Glycerophospholipide erfüllen eine Reihe spezieller Funktionen, z.B. als oberflächenaktive Substanzen der Lungenalveolen [60e], Komponenten der Gallenflüssigkeit [60b] etc..

Je nach Organismus und Stoffwechsellaage wird das Glyceringerüst der Glycerolipide aus der Glykolyse [26,62e,63e], der Gluconeogenese [26,62f,63f], dem Entner-Doudoroff-Abbau (nur in Bakterien) [63g] oder dem oxidativen [62g,63h] bzw. reduktiven Pentosephosphat-Zyklus (in Chloroplasten grüner Pflanzen und in chemiautotrophen Bakterien) [26,62h,63i] bereitgestellt. Seine Ausgangsverbindung, DHAP, fällt in diesen Stoffwechselwegen unmittelbar als Zwischenprodukt an oder entsteht in einer abzweigenden Reaktion durch Isomerisierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat.

Alternativ zur Phosphatidsäure-Synthese via α GP kann DHAP auch direkt, ohne vorhergehende Reduktion seiner Ketogruppe, acyliert werden. Der Reduktionsschritt wird vor Addition der zweiten Acylgruppe in einer NADP-abhängigen Reaktion nachgeholt [60a,62c,63c,64,65,Ref.in 66]. Über den quantitativen Beitrag dieser Route zur Biosynthese der Glycerolipide in den einzelnen Organen ist wenig bekannt [67 u.Ref.]. In der Leber zumindest ist er bedeutend [60b,68 u.Ref.], ebenso in vielen Tumoren [60g,66,69] und in Zellen von Gewebekulturen normalen und neoplastischen Ursprungs [60h,69].

In den letzten beiden Fällen wurde eine enge Korrelation zwischen dem Anstieg der in gesunden Säugergeweben nur in geringen Mengen vorhandenen Glyceryletherlipide* und dem Abfall der α GPDH-Aktivität festgestellt [51]. Der Ausfall der α GPDH bewirkt einen erhöhten Spiegel an DHAP, der seinerseits zu einer Zunahme der Glycerolipid-Synthese via DHAP anstelle von α GP führt. Da Acyl-DHAP zu Alkyl-DHAP konvertiert wird, könnte die vermehrte Bildung von Acyl-DHAP in einem erhöhten An-

* Etherlipide finden sich nicht nur in Vertebraten (bes. in Nervenzellen [60i]); sie kommen in geringen Mengen in Pflanzen vor [63k] und machen z.B. in Mollusken <35% der Gesamt-Phospholipide aus [63k].

teil der Etherlipide am zellulären Gesamtlipid resultieren [60 h-i, 65, 66, 69]. Dazu paßt der Befund, daß Tumorgewebe besonders reich an NADP-abhängigen Oxidoreductasen ist, deren Substrate Ketogruppen-tragende Lipide sind [69].

Zellkulturen lassen, was das reziproke Verhältnis von α GPDH-Aktivität und Etherlipid-Konzentration betrifft, kaum Unterschiede erkennen, unabhängig davon, ob sie aus gesundem oder neoplastischem Gewebe angelegt wurden. Diese bemerkenswerte Tatsache legt den Schluß nahe, daß die geschilderten Verhältnisse eher den Zustand der mit einer erhöhten Wachstumskapazität einhergehenden Entdifferenzierung und Adaption widerspiegeln als essentielle Charakteristika des neoplastischen Prozesses selbst [51].

Die Konzentration der Triacylglycerine variiert in Tumoren innerhalb weiter Grenzen und kann sowohl unter wie auch über den in den gesunden Muttergeweben gemessenen Werten liegen [60g, 69]. Da die über Acyl-DHAP verlaufende Glycerolipid-Synthese selbst eine totale α GPDH-Defizienz voll kompensieren und zu einer massiven Anhäufung von Triacylglycerinen führen kann [70], dürfte das breite Konzentrationsspektrum letzterer am ehesten Ausdruck definierter, tumorspezifischer Fließgleichgewichte als Folge unterschiedlicher Intensitäten des Fett auf- und abbauenden Stoffwechsels sein. Daß ein reger Glycerolipid-Turnover stattfindet, glaubt man in den hohen α GP-Konzentrationen bestätigt zu sehen, welche die DHAP-Spiegel trotz äußerst niedriger α GPDH-Aktivität in Einzelfällen um das Mehrfache übertrafen [71]. Dieser Befund macht gleichzeitig deutlich, daß die absoluten DHAP-Spiegel allein wahrscheinlich nicht die einzige bzw. wichtigste Ursache des Anstiegs der Etherlipide in Tumoren darstellen.

Von allen gesunden Vertebratenorganen ist die α GPDH-Aktivität in der Leber am höchsten (S. 4). Es herrscht Übereinstimmung darüber, daß ein Großteil dieses Potentials, wenn auch wahrscheinlich nicht seine Gesamtheit [72], an der stofflichen Transformation des Glycerinskelets der Glycerolipide beteiligt ist. In diese Vorrangstellung schiebt sich die Leber allerdings erst am Übergang von der spätfetalen zur postnatalen Pha-

se [73]: im frühen menschlichen Feten z.B. unterscheiden sich die Leber-Werte der α GPDH noch nicht von jenen des cerebralen Cortex oder des Colon und liegen sogar um das 6-10 fache unter denen des Dünndarms [74].

Diese Tatsache gewinnt an Verständlichkeit, zieht man in Betracht, daß die Hauptenergiequelle des embryonalen, fetalen und neonatalen Stoffwechsels nicht Fett, sondern Glucose ist und daß die Lipogenese erst in den letzten Monaten des intrauterinen Lebens aus einem untergeordneten zu einem der zentralen Stoffwechselwege des adulten Organismus heranreift [75]. Parallel zum Abbau ihrer Funktion als primär blutbildendes Organ [76] übernimmt die Leber in immer größerem Maße die Aufgabe der stofflichen und energetischen Transformation der aus dem placentalen (exogen) und fetalen (endogen) Kreislauf antransportierten Metaboliten und des Exports der Transformationsprodukte in die Peripherie. Mit dieser Umstellung, die nach der Geburt durch Ausschaltung des placentofetalen und Aktivierung des hepatoportalen Kreislaufs im wesentlichen abgeschlossen ist, erlangt der anabole Glycerolipid-Stoffwechsel seine volle Kapazität in der Erfüllung der Funktion: Synthese von Triacylglycerinen und Glycerophospholipiden zur intrahepatischen Verwendung als Energiereserve bzw. als Membranbausteine und Gallesubstanzen und zum Export in extrahepatische Gewebe. Dabei wird der Anteil der als Rückgrat dieser Verbindungen fungierenden Glyceringruppierung durch die katalytische Wirkung der α GPDH hergestellt, der sich nicht aus dem Acyl-DHAP-Weg oder der Glycerinkinase-katalysierten Phosphorylierung des vorwiegend lipolytisch entstandenen Glycerins ableitet.

Da Fettgewebe keine [64,77-79] oder eine im Vergleich zu Leber und Niere nur sehr geringe Aktivität der Glycerinkinase besitzt [60d,78,80], kann es exogenes Glycerin nicht effektiv verwerten. Das Gleiche gilt für verfettende 3T3-Zellen [81,82], Abkömmlingen fetaler Mäuse-Fibroblasten [83]. In beiden Fällen wird der Bedarf an α GP vornehmlich durch Reduktion endogenen DHAP gedeckt [60d,84]. So ist es nicht überraschend, daß während der Verfettung der 3T3-Zellen die Aktivität der

α GPDH mehrhundertfach ansteigt [85]. In dieser Phase vollzieht sich auch die Ablösung des "embryonalen" durch den "adulten" Isoenzymentyp [86].

Zwischen Leber und Fettgewebe, den Organen mit dem intensivsten Glycerolipid-Metabolismus im adulten Säuger, findet ein permanenter, geregelter Stoffaustausch statt. Der Leber vorgeschaltet und mit ihr über die Vena portae indirekt verbunden ist ein Organ, dessen Aktivität die Richtung dieses Stoffwechsels über die Konzentration der Blut-Glucose als Regelgröße [62a] mittelbar beeinflusst: der Dünndarm.

Über seine Oberfläche - 200 m^2 beim Menschen - findet der Hauptteil der Resorption statt [87]. Vorwiegend im oberen Jejunum werden die in der Micellenphase emulgierten Lipolyseprodukte, in der Hauptsache Monoacylglycerine, langkettige Fettsäuren und Lysophospholipide [60c], am apikalen Pol der Enterocyten resorbiert, im glatten endoplasmatischen Reticulum zu (vorwiegend) Triacylglycerinen rekonstituiert und als solche nach Verpackung in Chylomikronen durch die basale und laterale Zellmembran in die Chylusgefäße der Darmzotten ausgeschleust. Über den Ductus thoracicus erhalten sie Anschluß an den Blutkreislauf und damit Zugang zur Leber [60c, 64, 87, 88].

Testet man die α GPDH entlang des Dünndarms, so ergibt sich - wie für viele andere am Processing der resorbierten Substanzen beteiligten Enzyme und Transportproteine [60c] - ein Aktivitätsgefälle von proximal nach distal [89], das sich zwischen der spätfetalen und frühen postnatalen Lebensphase eines Säugers etabliert. Weiters wurde beobachtet, daß unter Fettdiät die im proximalen Drittel konzentrierte α GPDH-Aktivität ansteigt [89].

Von den drei wichtigsten Synthesewegen, über die die Rekonstitution der Triacylglycerine verläuft - den 1-Acyl-GP-, Acyl-DHAP- und Monoacyl-Glycerin-Weg - ist letzterer am bedeutendsten und mit dem geringsten Energieaufwand verbunden [60c, 88]. Monoacyl-Glycerine kontrollieren, neben Hormonen, die Acylierung des aus der Glykolyse vorwiegend resorbierter Glucose [90] und der α GPDH-Reaktion stammenden α GP, wodurch

ein Maximum an Ökonomie erreicht wird. Die untergeordnete Bedeutung des 1-Acyl-GP-Weges in Mucosa-Zellen kommt nicht nur in der relativ zur Leber deutlich geringeren absoluten Aktivität der α GPDH zum Ausdruck, sondern auch in dem wenig dramatischen Aktivitätsanstieg bei Fettdiät [89].

Bemerkenswert, aber bisher unverstanden, ist die Tatsache, daß der fetale Dünndarm die von allen fetalen Organen höchste Aktivität der α GPDH besitzt [74]. Ihre Beteiligung an der mit einer hohen Produktion von Glycerophospholipiden verbundenen Entwicklung des Darmrohres allein dürfte dieses Phänomen nicht ausreichend erklären, da auch die Enterocyten des adulten Dünndarms eine außerordentlich hohe Regenerationsrate [87] und damit Glycerophospholipid-Biosynthese aufweisen, ohne daß sich diese in der Größe der α GPDH-Aktivität niederschlägt.

Die α GPDH-katalysierte Dehydrogenierung von α GP zu DHAP, unter Standardbedingungen thermodynamisch nicht begünstigt (S. 2), ist eine der Reaktionen, über die Glycerin Anschluß an die Glykolyse, bzw. deren Umkehrung, gewinnt [62e-f, 63e-f]. Glycerin stammt bei Wirbeltieren meist aus der Lipolyse von Triacylglycerinen.

Durch Gluconeogenese werden z.B. in Leber und Niere der neugeborenen Ratte die während des ersten Lebensstages vollkommen aufgebrauchten Glycogenspeicher auf Kosten des Fettgewebes wieder aufgefüllt [73]. Ob neben Glycerin auch größere Mengen von Aminosäuren verbraucht werden, wird wegen ihres Bedarfs bei der Proteinsynthese des schnell wachsenden Organismus für wenig wahrscheinlich gehalten [Ref. in 73].

Bei der bereits mehrere Tage hungernden adulten Ratte kann die Homöostase des Glucose-Spiegels im Blut und somit eine adäquate Versorgung der Nervenzellen des Gehirns mit Glucose nur durch Gluconeogenese aus Metaboliten wie Glycerin, Lactat, Pyruvat und glucogenen Aminosäuren in der Leber und Nierenrinde aufrechterhalten werden. Mit zunehmender Produktion von Ketonkörpern in der Leber und des dadurch möglichen teilweisen Ersatzes der Glucose in einer Reihe von Geweben reduziert sich das Potential der Gluconeogenese in der Folge auf konstantes,

niedriges Niveau.

Die Kinetik der Gluconeogenese, ihre Ausgangssubstanzen und Stoffwechselwege sind bei Säugern, den Menschen eingeschlossen, weitgehend identisch [91]. Ihre Regulation in höheren Tieren ist jedoch species-abhängig [92].

In Leber-Tumoren ist die Fähigkeit zur Gluconeogenese stark eingeschränkt [93].

Aus Lebern und Nieren einer Anzahl von Vertebraten isolierte Peroxisomen (microbodies) enthalten eine α GPDH, die der cytoplasmatischen Variante elektrophoretisch ähnlich ist. Im Vergleich mit dieser aber zeigt sie eine mehr als doppelt so hohe spezifische Aktivität [94]. Sollten Peroxisomen in der lebenden Zelle tatsächlich in oxidative Abbauprozesse involviert sein, wofür die Substratspezifität der in ihnen enthaltenen Enzyme spricht, stellt sich für die peroxisomale α GPDH die Frage einer Beteiligung am Fettabbau durch Katalyse der Konversion von α GP zu DHAP.

Die Freisetzung von Glycerin aus Triacylglycerinen und seine Einschleusung über die α GPDH-Reaktion in die Embden-Meyerhof-Kette ist auch für Pflanzen gesichert. Dieser Weg wird vor allem in Samen, Früchten und in den Stämmen vieler Bäume beschrieben [26].

1.4.2. Die α GPDH im Stoffwechsel des Wasserstoffs

Während als Zentrum der stofflichen Transformation die Leber gilt, steht unter den Organen, in welchen das Hauptgewicht der metabolischen Leistungen in der energetischen Transformation liegt, der Muskel mit an vorderster Stelle.

Wesentliche Einblicke in die Organisation und Dynamik des energieliefernden Stoffwechsels verdanken wir Th. Bücher, A. Delbrück, M. Klingenberg, D. Pette, W. Vogell, E. Zewe und Mitarbeitern (vorm. Marburg) und den Amerikanern B. Chance, R.W. Estabrook und B. Sacktor.

An vorzüglichen Modellen, den hochspezialisierten Geweben (Flug- und Sprungmuskel; Fettkörper) der afrikanischen Wanderheuschrecke, *Locusta migratoria*, studierten sie in einer Fülle methodisch reizvoller Untersuchungen - u.a. respiratorischen und spektrophotometrischen Messungen an isolierten Mitochondrien [95-98], Bestimmungen zellulärer Metabolitgehalte bei Ruhe und im Flug [10,99,100], Berechnungen relativer Flußgrößen von auf alternativen Wegen aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien einfließenden Wasserstoffströmen auf der Basis kinetischer Konstanten [100; revidiert in 101] und Vergleichen histologischer und enzymatischer Muster [102,103] - die biochemische und cytologische Organisation energieproduzierender Reaktionswege, deren relative Gewichtung und funktionelle Verflechtung [10,104].

Hinsichtlich der enzymatischen Ausrüstung des Insektenflugmuskels und der in ihm unter wechselnden experimentellen Bedingungen registrierten Metabolitbewegungen stellten sich folgende drei bedeutungsvollen Eigenheiten heraus:

1. Hohen Aktivitäten der α GPDH und α GPO* steht eine extrem niedrige Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH) gegenüber [10,100,102,104-108].
2. Selbst ein 20-30 minütiger Flug - die Zeitspanne, während der die Heuschrecke ausschließlich Kohlenhydrate verbrennt - führt zu keiner Anhäufung von Lactat oder α GP [10].
3. Unter Sauerstoffmangel steigt der Gehalt an α GP und Pyruvat erheblich, der an Lactat jedoch nur geringfügig an [10].

In diesen Eigentümlichkeiten kommt das enge Zusammenwirken zweier Mechanismen zum Ausdruck, die von Th. Bücher und M.

* Die 1919 von O. Meyerhof in Froschmuskelextrakten erstmals beobachtete "Oxydationserregung durch Glycerinphosphorsäure" [109] ist der Wirkung beider α -Glycerophosphat-Dehydrogenasen zuzuschreiben. Das mitochondriale Enzym, unter der Bezeichnung α -Glycerophosphat-Oxidase (α GPO) bekannt, wurde 1936 von D.E. Green aus Kaninchenmuskel isoliert [110] (MEYERHOF-GREEN-Enzym; EC 1.1.99.5.). Beide Dehydrogenasen katalysieren zwar dieselbe Reaktion, unterscheiden sich jedoch strukturell wie in ihren kinetischen Parametern [80].

Klingenberg um die Mitte der fünfziger Jahre erneut aufgegriffen* bzw. erstmals formuliert wurden, nämlich der α -Glycerophosphat-Pyruvat-Dismutation [10,631,99,100,111,112] und des α -Glycerophosphat-Zyklus [10,62i,63m,96,99,100,104,113]. Sie beschreiben Wege des Wasserstoffs im Cytoplasma bzw. zwischen Cytoplasma und Mitochondrien, deren Ziel die Aufrechterhaltung des physiologischen NAD^+/NADH -Redoxstatus und damit des energetischen Potentials des extramitochondrialen ATP-Systems bzw. die mitochondriale Oxidation von cytoplasmatischem NADH ist.

Um Funktions- und Gewebsspezifitäten zu erfassen, wurden die Untersuchungen auf verschiedene Muskeltypen und andere Gewebe von Vertebraten ausgedehnt. Dabei stellte sich heraus, daß beide Mechanismen, deren Funktion für die Insekten unbedingte Voraussetzung zur Flugfähigkeit ist, auch im Skelettmuskel der Warmblütler zur Wirkung kommen [9,10,48,100,114-120]. An seinem Beispiel seien sie kurz erläutert:

Bei plötzlich maximaler Muskelleistung (z.B. Sprint, Tetanus) kann der Fluß in der Embden-Meyerhof-Kette innerhalb weniger Sekunden um den Faktor 10^2 bis 10^3 ansteigen [119]. Die Beobachtung, daß trotz Erhöhung des intrazellulären Lactat-Gehalts um mehr als eine Größenordnung der Quotient Lactat/Pyruvat** eher fallende Tendenz hat [10,112,117-119], ist unter anderem der Wirkung der α GP-Pyruvat-Dismutation zuzuschreiben: ein Bruchteil des bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat verbrauchten NAD^+ s wird durch die α GPDH-katalysierte Reduktion von DHAP fortlaufend regeneriert. Das stoichiometrisch mit Pyruvat akkumulierte α GP kann, im Gegensatz zur Milchsäure, die Zellmembran nicht durchdringen [100]. Es wird in der aeroben Erholungsphase von der in der äußeren Phase der mitochondrialen Innenmembran verankerten α GPO (EC 1.1.99.5.) [121,122] in einer irreversiblen Reaktion reoxidiert. Während die auf FAD übertragenen Reduktionsäquivalente zur oxida-

* α GP-Pyruvat-Dismutation wurde bereits von den Arbeitskreisen G. Embdens und O. Meyerhofs experimentell demonstriert [123, Ref. in 100].

** ca. 12:1, im Insektenflugmuskel bei Ruhe und im Flug ca. 2:1

tiven Phosphorylierung auf die Atmungskette übertragen werden, diffundiert das Oxidationsprodukt, DHAP, ins Cytoplasma zurück und kann, jeweils nach Reduktion durch NADH, wiederholt diesen α GP-Zyklus durchlaufen. Zu dessen Betrieb genügt bei ausreichender Sauerstoffzufuhr eine katalytische Menge an DHAP. Dieser in tierischen Zellen beschrittene Weg zur Einschleusung von Reduktionsäquivalenten in die Mitochondrien kompensiert die Unfähigkeit von NADH, mitochondriale Membranen zu durchdringen [124].

Während glykolytisches NADH im Insektenflugmuskel praktisch ausschließlich via α GP-Zyklus oxidiert wird [101,125,126], verteilt sich der Wasserstoffstrom im Sprungmuskel der Heuschrecke und in den Zellen der Wirbeltiere auf alternative Wege [10,62,63,100,103,117,119,127]:

zum einen auf den α GP-Zyklus, der in Muskel- und Nervenzellen und in den Zellen der Nierenrinde eine gewisse, in quantitativer Hinsicht noch wenig scharf umrissene Bedeutung erlangt, zum anderen auf weitere Wasserstoff-Transportsysteme, z.B. den Malat-Aspartat-Zyklus [128,129], der in Herz und Leber im Vordergrund steht, und schließlich, in der LDH-Reaktion, auf Lactat, welches in Muskelzellen bei maximaler Anstrengung in großen Mengen entsteht und wegen seiner Permeationsfähigkeit der Zelle partiell verloren geht. Kompetitive Beziehungen zwischen diesen drei Wasserstoff-Akzeptorsystemen werden diskutiert [63m,118,119,127,Ref.in 130].

In der weißen Muskulatur des Thunfisches z.B., die eine außerordentlich hohe Kapazität zur anaeroben wie aeroben Glykolyse und dementsprechend hohe Aktivitäten der LDH und α GPDH besitzt [131], wird eine energetisch ineffektive, gleichzeitige Wirksamkeit beider Enzyme dadurch ausgeschaltet, daß deren Konkurrenz um die limitierte Menge cytoplasmatischen NADHs in Abhängigkeit von der Sauerstoffspannung des Muskels durch den Typ ihrer Isoenzyme, Temperatur und pH, und durch die Spiegel der beiden regulierenden Schlüsselmetabolite, Kreatinphosphat und α GP, entschieden wird:

im normoxischen, ruhenden Muskel oder in Geweben mit LDH-Untereinheiten überwiegend vom H-Typ kommt es bei hohem Kreatinphosphat

phat- und niedrigem α GP-Spiegel, niedriger Temperatur und hoher pH, zu einer Hemmung der LDH und einer Aktivierung der α GPDH und damit des α GP-Zyklus. Unter hyp- oder anoxischen Bedingungen, hoher Temperatur und niedriger pH, d.h. im hochaktiven Muskel, steigt der α GP-Spiegel und hemmt die produkt-sensitive α GPDH*, während die sinkende Kreatinphosphat-Konzentration zu einer Enthemmung der LDH führt und so die Bildung von Lactat fördert [132].

Eine derartige Kontrolle ist offensichtlich weit verbreitet, da in hyp- oder anoxischen Phasen Lactat immer zu weit höheren Konzentrationen akkumuliert als α GP, obwohl in der Zelle beide Dehydrogenasen gegenwärtig sind. Ähnliche Verhältnisse traf man auch im ischämischen, perfundierten Herz [133] und im Skelettmuskel der Ratte an [134].

Die Bedeutung der α GP-Pyruvat-Dismutation und des α GP-Zyklus im Sauerstoffwechsel wurde in der Vergangenheit wiederholt in Frage gestellt [z.B. 114,127,130,135]. Tatsächlich kann sich der Beitrag dieser beiden Mechanismen an der energetischen Transformation in einer beliebigen Säugerzelle in seiner absoluten Größe kaum mit jenem im Insektenflugmuskel messen; dennoch steht außer Frage, daß sie dort an Bedeutung gewinnen, wo sie in enger Beziehung zu den speziellen Funktionen einzelner Organe stehen [114,136,137].

Seit man erkannte, daß definierte Leistungen eines Gewebes sich nicht nur im histologischen Feinbau [103,125,126,138,139] und in der qualitativen Enzymausstattung, sondern auch in den

* Affinitäten von α GPDHs verschiedener Vertebraten- und Invertebraten-Muskeln für α GP [132]:

weiße Muskulatur (Thunfisch)	0,25	aus Dixon-Plots bestimmt <u>K₁-Werte</u> (mM) für α GP
weiße Muskulatur (Forelle)	1,1	
weiße Muskulatur (Schildkröte)	0,93	
gemischte Muskulatur (Kaninchen)	0,5	
Flugmuskulatur (Honigbiene)	5,0	
Mantelmuskulatur (Tintenfisch)	15,0	

Die Enzyme aus dem Flugmuskel der Honigbiene und dem Mantelmuskel des Tintenfischs zeigen die von allen bisher bekannten α GPDHs geringste Empfindlichkeit gegen Produkthemmung durch α GP. Interessanterweise wirken sie in Geweben, die extrem sauerstoffabhängig sind und unter physiologischen Bedingungen nie anaerob stoffwechseln.

quantitativen Relationen der aus distinkten Zellräumen gewonnenen Enzymaktivitäten widerspiegeln [10,102,120,140], basieren die Schlußfolgerungen und Hypothesen zahlreicher Arbeiten auf den absoluten Größen von Enzymaktivitäten. Folgendes bleibt zu bedenken: in ähnlicher Weise, wie unter definierten, aber unphysiologischen Testbedingungen registrierte Aktivitäten und die aus ihnen errechneten kinetischen Konstanten kaum mehr als das potentielle Leistungsprofil eines gegebenen Enzyms beschreiben können, auf keinen Fall aber direkte Zusammenhänge mit dessen Funktion und Beziehungen in der komplexen Dynamik zellulärer Vorgänge herzustellen in der Lage sind, repräsentieren Enzymmuster lediglich das Potential eines gewissen Stoffwechselweges, nicht notwendigerweise aber tatsächlich ablaufende metabolische Prozesse. Selbst das eleganteste biologische Experiment, in dem - willkürlich oder unwillkürlich - natürliche Strukturen verletzt oder Bedingungen der inneren oder äußeren Umwelt über die normalen Schwankungsbreiten hinaus verändert werden, bleibt ein arte factum, eine, im ursprünglichen Wortsinn, bestenfalls an die Realität grenzende meisterhafte Simulierung eines biologischen Teilprozesses. Die Vorlage tauglicher Kriterien, an Hand deren die Realitätsnähe eines Experiments beurteilbar wird, ist in jedem Fall geboten. Ein Beispiel:

Bekanntlich wird das Meyerhof-Green-Enzym und mit ihm der α GP-Zyklus durch Ca^{++} aktiviert, das als Folge des muskulären Aktionspotentials aus dem sarkoplasmatischen Reticulum freigesetzt wird [126]. Unter dem Aspekt der oben angesprochenen limitierten Aussagekraft von in vitro-Experimenten erscheinen jene Untersuchungen von besonders fraglichem Wert, in denen auf Grund vernachlässigbar geringer Aktivitäten der α GPO auf die Bedeutungslosigkeit des α GP-Zyklus im untersuchten Gewebe geschlossen wird, ohne für eine quasi-physiologische Konzentration an Ca^{++} oder Mg^{++} im Testansatz gesorgt zu haben [z.B. 127]. Die Höhe der α GPDH-Aktivität wäre nämlich im gegebenen Fall nicht limitierend gewesen.

Milchsäureproduktion trotz ausreichender Sauerstoffzufuhr ist einer der regelmäßigsten und zugleich charakteristischsten Befunde in neoplastischen Geweben [141]. Da die Aktivitäten der LDH und α GDH in vielen Tumoren in einem reziproken Verhältnis zu jenen im Insektenflugmuskel stehen [9,48], der cytoplasmatische Arm des α GP-Zyklus in Krebszellen demnach als defekt zu betrachten ist, stellt die Reduktion von Pyruvat zu Lactat mangels alternativer cytoplasmatisch-mitochondrialer Wasserstoff-Transfersysteme die einzige Möglichkeit zur Regenerierung von NAD^+ dar [142]. Diese Schlußfolgerung wurde jedoch wiederholt in Frage gestellt [z.B. 143 u.Ref.], sodaß die Diskussion um die Ursache(n) des genannten Phänomens als noch nicht abgeschlossen anzusehen sind.

Wenig bekannt ist die Tatsache, daß es neben dem Insektenflugmuskel noch ein weiteres Paradebeispiel eines Systems mit einem hochaktiven, funktionell essentiellen α GP-Zyklus gibt, nämlich verschiedene Trypanosomatiden-Species [144-147]:

Pathogene Formen dieser von der Tse-Tse-Fliege übertragenen Flagellaten, von denen die Arten *Trypanosoma brucei brucei* (Erreger der Nagana-Seuche) und *Trypanosoma brucei gambiense* (Erreger der Schlafkrankheit) zu den bekannteren zählen, sind trotz der rapiden Fortschritte der Medizin auch heute noch eine schreckliche Geißel für Mensch und Tier vor allem in den tropischen Regionen Afrikas [148]. Der durch Infektion der Haustiere, insbesondere von Rindern, verursachte Schaden ist erheblich und bedeutet eine schwere Bürde für die sich entwickelnden jungen Ökonomien. Superinfektionen mit zwei oder drei verschiedenen Trypanosomenspecies sind keine Seltenheit [149]. Bis heute ist das von den Erregern ausgehende pathogene Prinzip unbekannt [150]. Diese pleomorphen Flagellaten zeichnen sich durch eine Reihe cytologischer [61d] und biochemischer [147] Besonderheiten aus, unter anderem dadurch, daß Blutbahn- und Kulturformen während ihres Lebenszyklus parallel zu den morphologischen Veränderungen alternierend mitochondriale Strukturen, Krebs-Zyklus-Enzyme und Cytochrome zur Entfaltung bringen und wieder zurückbilden. In der schlanken, multiplikativen Blutbahnform mit ih-

rem reduzierten Mitochondrion besteht der einzige bedeutendere energieliefernde Stoffwechselweg in einer modifizierten Form der Glykolyse, bei der Glucose nur bis zur Stufe des Pyruvats abgebaut werden kann. NADH wird ausschließlich über den α GP-Zyklus oxidiert [144,147,Ref.in 151]. Da ein Großteil der α GPDH in Peroxisomen lokalisiert ist [151], deren Membran zwar für kleine Moleküle, nicht aber für NADH permeabel ist [146], vermutet man in ihnen ein zweites Enzym (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ?), das NAD^+ intrapartikulär reduzieren kann. Die KCN-insensitive, FAD-abhängige mitochondriale α -Glycerophosphat-Dehydrogenase [144] ist mit einer partikulären α -Glycerophosphat-Oxidase gekoppelt, die den Wasserstoff - ohne Phosphorylierung von ADP - von FAD direkt auf molekularen Sauerstoff überträgt [147]. Beide zusammen bilden das sog. α -Glycerophosphat-Oxidase-System. Bemerkenswert ist die im Vergleich zu Säugermitochondrien bis zu 50 fach höhere Geschwindigkeit, mit der das einzelne Mitochondrion der Flagellaten Wasserstoff veratmet [152].

Eine interessante Verflechtung schließlich zwischen dem Lipid- und Energiestoffwechsel entdeckte man im braunen Fettgewebe des Hamsters [153]:

Braunes Fettgewebe [60d] findet man nur in bestimmten Körperregionen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Produktion von Körperwärme und ist vor allem bei Winterschläfern und Neugeborenen gut ausgebildet. Seine Mitochondrien sind zahlreicher und größer als die des weißen Fettgewebes; auch sein Gehalt an Cytochromen ist höher. Es ist bekannt, daß bei Thermogenese gleichzeitig Fett mobilisiert und synthetisiert wird [154,Ref.in 153]. Lipolytisch anfallende Fettsäuren - sie stellen den Hauptbrennstoff zur Wärmeentwicklung [155,Ref.in 153] - und/oder Acyl-CoA-Ester führen zu einer Hemmung der α GPO, wodurch bei unverändert hoher Aktivität der α GPDH α GP akkumulieren und zur Resynthese von Triacylglycerinen in den Lipidstoffwechsel einfließen kann. Von der Existenz eines über Acyl-DHAP führenden Wegs der Triacylglycerin-Synthese in braunem Fettgewebe ist nichts bekannt.

Neben dieser regulatorischen Funktion üben die beiden Partner des α GP-Zyklus mangels anderer effektiver Wasserstoff-Transfersysteme auch die Hauptkontrolle über das extramitochondriale NAD^+/NADH -Redoxgleichgewicht aus. Dadurch wird die Glykolyse in Gang gehalten und ATP bereitgestellt, welches bei der Noradrenalin-stimulierten, entkoppelten Atmung in einer zur Fettsäurenaktivierung und Bildung von zyklischem AMP nicht ausreichenden Menge synthetisiert wird.

Die Doppelfunktion des α GP-Zyklus im braunen Fettgewebe wurde im Prinzip schon vor vielen Jahren vermutet [156], als man dem Befund einer außergewöhnlich hohen α GPO-Aktivität in diesem Gewebe experimentell nachging [157]. In keinem anderen Organ der Ratte erreicht sie ähnlich hohe Werte [156]. Für die α GPDH wurde von denselben Autoren [156] eine Gewebeverteilung festgestellt, die von der auf S.4 wiedergegebenen erheblich

abweicht:	Leber	100	relative Aktivitäten; bez. auf Leber=100 (s. S.4)
	Niere	28	
	weißes Fettgewebe	112	
	braunes Fettgewebe	230	

1.5. Isoenzyme der α GPDH

Physikochemische, biochemische, genetische und medizinische Studien haben die Bedeutung der Isoenzyme mit ihren charakteristischen katalytischen Eigenschaften, Gewebeverteilungen, intrazellulären Lokalisationen und Entwicklungsprofilen für eine Vielzahl von Disziplinen unterstrichen: die Struktur-forschung, Enzymologie, Stoffwechselforschung, Entwicklungs-physiologie, molekulare Genetik, Populationsgenetik, Evolutionsforschung im weitesten Sinne, die klinische Diagnostik und sogar die Kriminalistik [158-161].

Erste Vermutungen über die Existenz verschiedener molekularer Formen der α GPDH wurden 1960 von M.U. Tsao geäußert, als er in der Elektrophorese des Enzyms aus schonend hergestelltem Rattennieren-Homogenat zwei Banden erhielt [162]. Seither wurden Isoenzyme der α GPDH in Geweben mehrerer Species nachgewiesen, z.B. des Kaninchens [3,4,7,163-167*; 8,168-177],

der Ratte [13; 172,178-181], der Maus [14,182-185], des Menschen [15; 186,187], des Schweins [188], des Huhns [17, 72,189-192], von *Drosophila melanogaster* [21,193-201] und anderen Insekten [19,20,202,203].

Drosophila melanogaster ist eines der genetisch am besten bekannten eukaryontischen Systeme. Von ihr sind gegenwärtig etwa 60 verschiedene Gene beschrieben und kartiert, die die Aktivitäten oder molekularen Eigenschaften eines oder mehrerer Enzyme oder spezifischer Proteine beeinflussen [198].

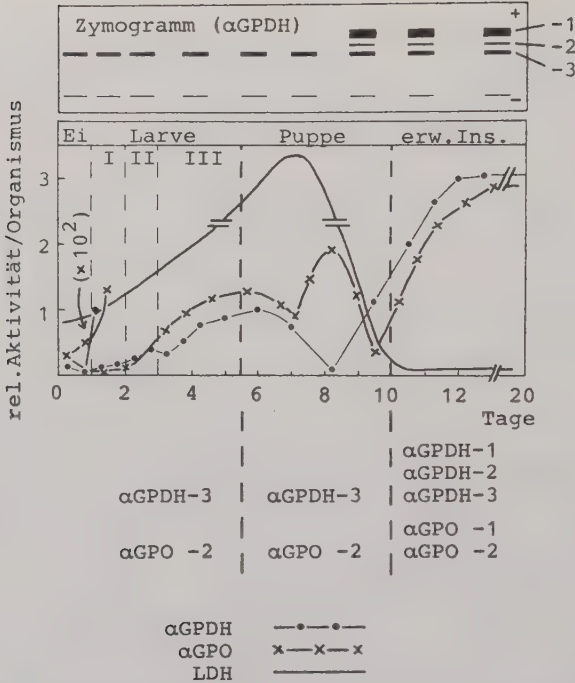
Das Gen/Enzym-System α GPDH in *Drosophila* stellt ein ideales System zur Erforschung der Genexpression während der Entwicklung dar. Die Aktivität der α GPDH ist mit drei hinsichtlich Gewebespezifität und zeitlicher Expression individuell angelegten isoenzymatischen Species assoziiert. Jedes dieser Isoenzyme ist, die Erfüllung unterschiedlicher metabolischer Aufgaben reflektierend, durch individuelle physikochemische und kinetische Parameter charakterisiert [200,201].

Das Entwicklungsprofil der α GPDH, α GPO und LDH in *Drosophila* (Abbildung 1) spiegelt, beispielhaft für alle flugfähigen Insekten, die mit dem Eintritt ins adulte Stadium und der Entwicklung der Flugmuskulatur vor sich gehende dramatische Umstellung vom primär anaeroben zum ausgesprochen aeroben Stoffwechsel wieder (vgl. auch die Sequenz morphologischer und enzymatischer Muster bei der Entwicklung der indirekten Flugmuskeln von *Locusta migratoria* [103,138,139]).

Während der Gipfel der α GPDH-Aktivität (Isoenzym α GPDH-3) im späten Larvenstadium primär auf die intensive Phospholipid-Synthese (Vermehrung der Zellmasse) [205], vor allem im Fettkörper, dem Hauptorgan des Lipidstoffwechsels und der Lipidspeicherung in Insekten [206]**, zu beziehen ist, fällt das folgende Minimum in das durch Histolyse gekennzeichnete Puppenstadium. Die LDH ist, mit Ausnahme des Fettkörpers, hoch-

* Literatur über die Kaninchenmuskel- α GPDH vor Erscheinen der ersten Publikation über deren Isoenzyme

** Der Fettkörper weist, relativ zu anderen Larvengeweben, geringe Aktivitäten der LDH und wahrscheinlich [200] auch der α GPO auf, aber eine hohe Aktivität der α GPDH.



αGPDH-3	larvale Form	<50% im Fettkörper, Rest gleichmäßig im Körper verteilt (in adulter Fliege Hauptmenge ebenfalls im Fettkörper; im Abdomen nur αGPDH-3)
αGPDH-2	Hybrid aus den Untereinheiten von αGPDH-3/αGPDH-1 ??	in Geweben, in denen die Untereinheiten von αGPDH-3 und αGPDH-1 synthetisiert werden
αGPDH-1	adulte Form	überw. im Thorax (Sitz des indirekten Flugmuskels)
αGPO-2	larvale Form (max. im späten Puppenstadium)	ubiquitär (als Nebenform auch im adulten Insekt)
αGPO-1	adulte Form	Überw. im Thorax

Über die Isoenzyme der LDH, die in der Larve, Puppe und im adulten Insekt in entwicklungspezifischen Mustern auftreten, siehe [195,204]. Die höchsten LDH-Aktivitäten wurden in larvalen Muskeln gemessen [198].

Abbildung 1 Entwicklungsprofil der αGPDH, αGPO und LDH in *Drosophila melanogaster* (nach [198,200])

aktiv und dürfte, in Analogie zum anaeroben Vertebratenmuskel, zusammen mit der α GPDH-3 an der Regulation des NAD^+/NADH -Gleichgewichts beteiligt sein. Diese Funktion ist in Larven von besonderer Bedeutung, da diese häufig Medien mit sehr geringer Sauerstoffspannung ausgesetzt sind.

Die Funktion der α GPO (Isoenzym α GPO-2)* ist in der Larve am ehesten in der Bereitstellung von ATP zur Lipidsynthese zu sehen, in der Puppe hingegen sorgt sie für Abtransport und energetische Transformation des bei der Histolyse durch Phospholipidabbau massiv anfallenden α GP.

Das koordinierte Hochschnellen der α GPDH- und α GPO-Aktivität (Isoenzyme α GPDH-1 und α GPO-1) im adulten Thorax, gekoppelt mit dem Verschwinden der LDH, ist mit der Differenzierung der Flugmuskulatur korreliert. Die nahezu synchrone Expression der beiden adulten Isoenzymentypen in einem Gewebe, in dem der Ausbau eines engmaschigen Tracheolarsystems zur kontinuierlichen Versorgung seiner großen und zahlreichen Mitochondrien mit atmosphärischem Sauerstoff unmittelbar vor der Vollendung steht, darf als ein weiteres Argument für die kooperative Beziehung der beiden Dehydrogenasen im α GP-Zyklus gewertet werden [125,126,195,198].

Weit weniger als im Fall von *Drosophila* wissen wir über die Isoenzyme des Kaninchens. Ihre genaue Zahl ist unbekannt und die verfügbare Information über spezifische Eigenschaften intensiver untersuchter Formen wegen zum Teil erheblicher Diskrepanzen nur bedingt verwertbar.

Hinsichtlich chemischer Unterschiede in den Formen aus Leber und Muskel sind die bisherigen Mitteilungen sehr widersprüchlich: Während Otto u. Mitarbeiter [169] auf signifikante Differenzen in der Aminosäurezusammensetzung** hinweisen, halten Ostro u. Fondy [173] die aus Skelettmuskel, Leber und

* Die Isoenzyme der α GPO wurden noch nicht isoliert und charakterisiert.

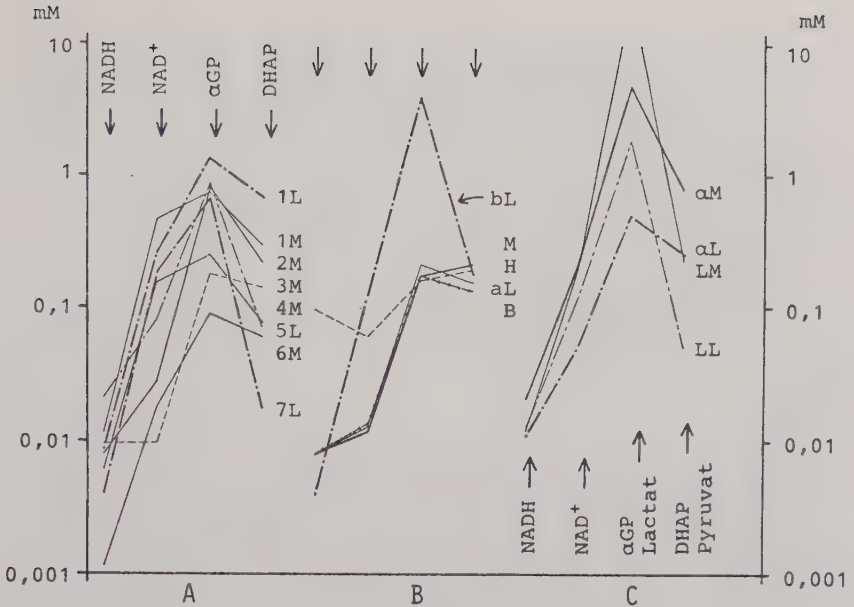
** Interessanterweise scheint die Aminosäurenanalyse der Kaninchenleber- α GPDH mit der der Menschenleber- α GPDH eine größere Ähnlichkeit zu haben als mit jener der α GPDH aus Kaninchenmuskel.

Brustdrüse isolierbaren Hauptkomponenten ($pI = 6,5$; M,aL,B in Abbildung 2B) auf Grund ihrer Zusammensetzung und ihres physikochemischen Verhaltens für identisch, unterschiedlich aber zum Isoenzym aus dem Herzmuskel ($pI = 6,1$; H in Abbildung 2B) und der stark anionischen Enzymvariante im Brown-Pearce-Karzinom der vorderen Augenkammer. Die Ansicht dieser Autoren wird von Lee u. Choy [172] geteilt, die für Skelettmuskel und Leber, nicht aber für den Herzmuskel identische immunologische Determinanten feststellten.

Über deutliche Unterschiede im kinetischen Verhalten der molekularen Formen aus Leber und Skelettmuskel dagegen herrscht, mit Ausnahme der Daten von Ostro u. Fondy [173] (Abbildung 2 B), weitgehende Übereinstimmung (Black [207], Lee u. Craine [168], Otto u. Mitarb. [169], Bentley u. Dickinson [208], Mc Loughlin u. MacQuarrie [176], McLoughlin [209]). Allerdings streuen die von verschiedenen Autoren veröffentlichten Michaelis-Konstanten für Coenzym und Substrate erheblich und weichen in einzelnen Fällen um mehr als eine Zehnerpotenz voneinander ab. In Abbildung 2A wurde versucht, durch graphische Darstellung einer Auswahl von K_M -Werten einen Eindruck vom Ausmaß dieser Streuung zu vermitteln. Ihre Ursachen dürften in der Hauptsache in unterschiedlichen Testbedingungen in Verbindung mit dem komplexen Verhalten eines allosterischen Enzyms [168,170,207,210-216], in der fraglichen Homogenität einzelner Enzympräparate [z.B. 168] und in der Gegenwart inhibitorisch wirkender Anionen im Testansatz zu suchen sein [z.B. 169; 13,176,180,215,216].

Abbildung 2 Vergleich von Michaelis-Konstanten für Coenzym und Substrate

- A der α GPDH aus Skelettmuskel und Leber des Kaninchens (Streuung der Werte verschiedener Autoren)
- B der α GPDH aus Skelettmuskel, Herzmuskel, Leber und Brustdrüse des Kaninchens (Ostro u. Fondy, 1977)
- C der α GPDH und LDH aus Brustmuskel und Leber des Huhns (Senkbeil u. White, 1978, Parallel Evolution of Pairs of Dehydrogenase Isoenzymes)



##	Kaninchen-	I.P.	pH	NADH	NAD ⁺	αGP	DHAP	Lit.	
4M	Skeletmuskel	7,8	0,0063	0,160	0,260	0,080		[208] Black	(1966)
3M	Skeletmuskel	7,5	0,01	0,01	0,19	0,15		[211] Fondy et al.	(1969)
7L	Leber	7,5	0,0042	0,19	0,68	0,018		[168] Lee et al.	(1971)
1M	Skeletmuskel	7,6	0,0119	0,470	0,770	0,310		[169] Otto et al.	(1972)
1L	Leber	7,6	0,009	0,265	1,400	0,720		[169] "	"
	Fettgewebe	7,5	0,0043	0,0044	0,40	0,25		[171] Warkentin et al.	(1973)
6M	Skeletmuskel	7,0	0,0012	0,0185	0,094	0,063		[209] Bentley et al.	(1974)
2M		8,0	0,0081	0,029	0,850	0,230		[209] "	"
		9,0	0,0092	0,031	0,840	1,200		[209] "	"
5L	Leber	6,5	7,5	0,022	0,083	0,909	0,075	[176] McLoughlin et al.	(1978)
	Gehirn	6,5	#	0,01	0,01	0,3	0,2	[177] Kornbluth et al.	(1979)
		5,9	#	0,15	0,05	0,35	0,05	[177] "	"
M	Skeletmuskel	6,5	#	0,008	0,012	0,18	0,22	[173] Ostro et al.	(1977)
B	Brustdrüse	6,5	#	0,008	0,014	0,18	0,14	[173] "	"
aL	Leber	6,5	#	0,008	0,013	0,22	0,16	[173] "	"
bL		6,3	#	0,004	0,13	4,00	0,19	[173] "	"
H	Herzmuskel	6,1	#	0,10	0,063	0,17	0,20	[173] "	"
aM	Brustmuskel (Huhn)	7,0	0,021	0,23	4,9	0,83		[192] Senkbeil et al.	(1978)
aL	Leber (Huhn)	7,0	0,011	0,054	0,51	0,26		[192] "	"
LM	Brustmuskel (Huhn)	7,0	0,012	0,21	19,0	0,23		[192] "	"
LL	Leber (Huhn)	7,0	0,013	0,13	1,9	0,052		[192] "	"
				NADH	NAD ⁺	Lactat	Pyruvat		

in Richtung DHAP-Reduktion pH 7,5
in Richtung αGP-Oxidation pH 9,0

die K_m -Werte der unter dieser Spalte aufgeführten Isoenzyme sind in der Abbildung graphisch dargestellt. zur Identifizierung der Kurven: die Reihenfolge der Abkürzungen, von oben nach unten gelesen, stimmt mit der Reihenfolge (von oben nach unten) der rechten Kurvenendpunkte (DHAP-Werte) überein.

M in 2.Position = Muskel
L " " = Leber
α in 1.Position = αGPDH-
L " " = LDH-

Die Annahme einer strukturellen Individualität des Leber- und Skelettmuskel-Enzyms erhält auch von kürzlich publizierten Inhibitionsstudien mit Fettsäuren und Detergentien aus dem Arbeitskreis MacQuarrie's Unterstützung [174,175]. Offenbar reflektiert der Unterschied in ihren katalytischen Eigenschaften geringe, aber distinkte chemische Unterschiede, die mit weniger aufwendigen Analysetechniken nicht feststellbar sind. Im Fall der analogen Enzyme des Huhns stehen in ähnlicher Weise geringen Abweichungen in der Aminosäurezusammensetzung signifikant unterschiedliche katalytische Eigenschaften gegenüber [17].

Senkbeil u. White [192] erkannten in der paarweisen Korrelation der K_M -Werte für Coenzym und Substrate der α GPDH- und LDH-Isoenzyme aus Brustmuskel und Leber des Huhns eine quantitative Beziehung zwischen den katalytischen Eigenschaften der beiden Enzyme und folgern, daß sich die K_M -Werte und damit die an der Katalyse beteiligten Proteinstrukturen aus den Erfordernissen der Substratkonzentration und Stoffwechselfunktion entwickeln:

Beide Enzyme sind im Muskel-Stoffwechsel über die α GP-Dismutation metabolisch miteinander gekoppelt (S.14). Die bei der proportionalen Akkumulation von Pyruvat und α GP auftretenden Konzentrationen sind hoch relativ zu denen aerober Gewebe wie z.B. der Leber. Vergleicht man die K_M -Werte der α GPDH- und LDH-Isoenzyme, so liegen sie für beide im Brustmuskel etwa 10-fach höher als in der Leber (Abbildung 2C). Diese Assoziation proportional höherer K_M -Werte mit dem Potential für eine proportional höhere Anhäufung von Substraten kommt nicht nur der Aufgabe des Muskels als Organ zur energetischen und jener der Leber zur stofflichen Transformation entgegen [217-219], sondern läßt darüberhinaus eine parallele Evolution der Isoenzympaare als gekoppelte metabolische Einheit vermuten. Der Selektionsdruck zur Etablierung distinkter Muskel- und Leberenzyme für die gesamte Reaktionskette der Glykolyse beim Huhn dürfte in eben jenen unterschiedlichen Anforderungen an den Stoffwechsel der Embden-Meyerhof-Kette in beiden Geweben zu sehen sein.

Nach abwägender Beurteilung aller bisherigen Ergebnisse existieren in Skelettmuskel und Leber des Kaninchens mit hoher Wahrscheinlichkeit chemisch unterschiedliche, an eigenen Genorten kodierte Isoenzyme der α GPDH. Artefakte wie Desamidierung [220], SH-Gruppen-Oxidation [221] und limitierte Proteolyse [222] können zwar in ihren Erscheinungsbildern echte Isoenzyme imitieren; auch an das Vorliegen einer epigenetischen Modifikation oder differenter Konformationszustände [222,223] ist prinzipiell zu denken; dennoch dürfte im vorliegenden Fall kaum eine dieser Möglichkeiten als Ursache der Multiplizität in Frage kommen.

Vor einiger Zeit wurde in einer Kurzmitteilung [224] berichtet, daß sich die α GPDH der Leber entsprechend ihrer Kompartimentierung in einen cytosolischen (95%) und peroxisomalen Pool (5%) selbst noch einmal in mehrere molekulare Formen unterteilen läßt. Mit diesen zusammen wurde ein hitzestabiles Flavinpeptid isoliert, das die Dehydrogenase-Aktivität der peroxisomalen α GPDH stimuliert, nicht aber deren Reductase-Aktivität oder die Reductase-Aktivität der cytosolischen α GPDH. Es wurde postuliert, daß dieses Peptid für das hohe Dehydrogenase/Reductase-Aktivitätsverhältnis der peroxisomalen Enzymfraktion verantwortlich ist und darüberhinaus eine Interkonversion der multiplen Formen auslösen kann. Inwieweit diese Befunde weiterverfolgt wurden, ist nicht bekannt. Eine ausführlichere Mitteilung dieser Ergebnisse zumindest ist bisher nicht erschienen.

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, daß die Aufklärung der Primärstrukturen einzelner molekularer Formen einen wertvollen Beitrag zur Beantwortung der Frage nach Zahl und Natur der α GPDH-Isoenzyme beim Kaninchen leisten könnte.

1.6. Genetische Repräsentation der α GPDH

Über die genetische Repräsentation der α GPDH bzw. ihrer Isoenzyme beim Kaninchen ist bis heute nichts bekannt.

In der Annahme einer in grundsätzlichen Aspekten vergleichba-

ren Genorganisation bei artverwandten Species werfen wir deshalb einen Blick auf die α GPDH-Genorte der Maus. Zur Illustration genetischer Variabilität bei phylogenetisch entfernten Species betrachten wir schließlich die Verhältnisse bei Primaten und *Drosophila*. Über den Genort der NAD(P)-abhängigen α GPDH von *Escherichia coli* wurde bereits auf S.3 berichtet.

Das adulte, kationische Isoenzym aus dem Cerebellum der Maus, das zwischen dem 6. und 16. postnatalen Tag de novo synthetisiert wird und zu einem 100-fachen Anstieg der α GPDH-Aktivität führt [185], ist auf dem *Gdc-1* Locus von Chromosom 15 kodiert [225,226]. Neben der Hauptform, die in gesunden Organen nicht gewebespezifisch ist [184], gibt es einige weniger kationische, hitzelabile, nicht ubiquitär auftretende Formen und in verschiedenen Geweben geringe Mengen einer stark anionischen, sog. onkofetalen Form* [184]. Drei Allele (*b, c, d*) wurden identifiziert, die für die Änderung der Hitzesensitivität und elektrophoretischen Eigenschaften beim Übergang von der embryonalen zur adulten Form verantwortlich sind [182,227]. In dieser Zwischenperiode ist ein Hybriddimer isolierbar, bestehend aus einem embryonalen und einem adulten Monomer [185]. Für das Enzym der fetalen und neugeborenen Maus kodiert ein zweiter struktureller Locus, der von *Gdc-1* verschieden ist [14]. Dieses Isoenzym, hitzelabiler, anionischer und substrataffiner als das adulte [14], wird während der Fetalzeit exprimiert und wurde im Gehirn, Skelet- und Herzmuskel (vgl. [173]) und in Hautfibroblasten nachgewiesen [184]. Es wurde nicht in der fetalen Niere, Leber und Lunge gefunden, während der adulte Typ allein in den frühesten Stadien der Organogenese identifiziert wurde [14]. Der Zeitpunkt der Umschaltung zum adulten Enzymtyp ist gewebespezifisch [14].

Nach Untersuchungen des Kozak'schen Arbeitskreises [183] wird bei spontanen und induzierten Mäusetumoren die Expression des adulten Isoenzyms durch einen noch unbekannten Regulationsmechanismus supprimiert und die Transkription des fetalen Enzyms angeschaltet. Dagegen behaupten Fondy u. Mitarbeiter [184],

daß die in Ascitestumoren (z.B. L1210 Ascites-Leukämie) beschriebenen stark anionischen, sog. onkofetalen* Isoenzyme nichts mit den fetalen, schwächer anionischen Isoenzymen zu tun haben, sondern eigenständige Formen verkörpern.

Obwohl das Konzept der viralen Tumorgenese eine theoretische Basis für die Spekulation abgibt, daß es sich bei jenen stark anionischen Formen möglicherweise um Genprodukte virustransformierter Wirtszellen handelt, wurde wiederholt beobachtet [228,229], daß das Isoenzymmuster von Krebszellen auffällige Ähnlichkeiten zum embryonalen Isoenzymmuster des Muttergewebes aufweist. Die Isoenzyme der Pyruvatkinase können als eines der bekanntesten Beispiele dafür angeführt werden [230]. Diese Form der Reprogrammierung des Genoms erlaubt die Interpretation des Krebses als eine Entgleisung der Zelldifferenzierung [231] mit den für embryonale Zellen charakteristischen Eigenschaften der fortgesetzten Zellvermehrung und der Fähigkeit zur Ortsveränderung.

Die in verschiedenen Geweben von Primaten beobachteten Isoenzymmuster deuten auf die Existenz von Homo- und Heterodimeren der α GPDH [232,233], deren Expression von zwei getrennten Strukturgenen (GPD_1, GPD_2) kontrolliert wird [232-234]. Für jedes Monomer (α und β) konnte Polymorphismus demonstriert werden [232-234]. In Herz und Gehirn dürfte die Menge jeder Untereinheit vergleichbar sein; in Leber, Niere und Skelettmuskel befindet sich die Untereinheit α in hohem Überschuß [232,233]. Dieser mit GPD_1/GPD_2 bezeichnete Phänotyp setzt auf beiden Loci Homozygotie voraus. Eine an post-mortem-Skelettmuskelextrakten von 707 nicht verwandten Nordeuropäern durchgeführte Studie spricht für eine in zwei autosomalen Genen organisierte Kodierung der beiden polymorph auftretenden Untereinheiten der α GPDH [233]. Dabei wurden zwei seltene Phänotypen beobachtet: GPD_12-1/GPD_21 und GPD_11/GPD_22-1 [186, 234,235].

* Das Attribut "onkofetal" umfaßt korrekterweise alle in Phasen beschleunigten Wachstums und lebhafter Zellteilung (Tumor, fetales Gewebe) exprimierten, mehr oder weniger anionischen Isoenzymformen.

Bei *Drosophila melanogaster*, der einzigen für α GPDH polymorphen *Drosophila*-Species von 101 aus natürlichen Populationen untersuchten [236 u.Ref.], entstehen alle drei α GPDH-Isoenzyme in der Reihenfolge α GPDH-3 $\rightarrow$ α GPDH-2 $\rightarrow$ α GPDH-1 durch entwicklungsabhängige, schrittweise, posttranslationale Modifikation des homodimeren Genprodukts von *Gpdh*⁺ [194,196,198, 200]. Die Beobachtung koordinierter Isoenzymverschiebungen bei Allozym-Differenzen [200], und die Ergebnisse von Rekombinanten- und Aneuploiden-Kartierungen [193,196,200,237,238], Analysen von Null-Allelen [196,200,237] und proteinchemischen Untersuchungen der Isoenzyme [199-201] stützen diesen Befund. *Gpdh*⁺ liegt auf dem linken Arm von Chromosom II in zwei allozymatischen Allelen vor und kartiert für das S(low)-Allel bei 17,8 [193] und für das F(ast)-Allel bei 20,5 $\pm$ 2,5 [237].

Die drei Isoenzyme unterscheiden sich in der Hitzestabilität, elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und im isoelektrischen Punkt. Ihr Fingerprintmuster nach tryptischer Verdauung ist bis auf ein einziges Peptid identisch. α GPDH-3 differiert vom primären Genprodukt lediglich um die Addition einer einzigen, chemisch noch nicht identifizierten Gruppe [200]. Die Konversion von α GPDH-1 über -2 nach -3 ist durch einen hitzelabilen, RNase-resistenten Faktor aus dem Überstand eines Larvenhomogenats auslösbar, nicht jedoch durch Extrakte aus adulten Fliegen [196]. Über Entwicklungsprofil und Gewebeverteilung der drei Isoenzyme wurde auf S.21ff. berichtet.

Drosophila melanogaster-Mutanten mit einem genetischen Defekt im *Gpdh-1* Locus sind flugfähig, wenn die Restaktivität der α GPDH 10% der α GPDH-Aktivität des Wildtyps nicht unterschreitet. Beträgt sie 5% oder weniger, fällt die Fliege nach einer Flugstrecke von ca. 1 m zu Boden und ist trotz wiederholten Versuchs nicht mehr in der Lage, erneut abzuheben. Ursache dieser Insuffizienz ist ein als Folge des defizienten α GP-Zyklus in Sekundenschnelle auftretender ATP-Mangel*. Ist der Me-

* Die Flugmuskulatur enthält nur eine geringe Menge an ATP, in *Phormia regina* z.B. 7 μ Mol/g Thorax-Frischgewicht [239], ausreichend für eine Flugzeit von nur 0,1 sec [240].

chanismus des α GP-Zyklus im Laufe der Evolution überhaupt verkümmert, wie bei der Heuschrecke *Romalea microptera* Beauvois, ist das Insekt zeitlebens flugunfähig [241]. Dementsprechend niedrig sind auch die α GPDH-Aktivitäten in den fadenförmigen Resten der Flugmuskeln, deren Enzymverteilungsmuster sehr an das von *Locusta migratoria* oder *Schistocerca vaga* vor der Imagoalhäutung erinnert [138,140,242].

Interessant ist, daß einige α GPDH-defiziente *Drosophila*-Mutanten nach ca. 25 Generationen trotz vernachlässigbar geringer α GPDH-Aktivität wieder flugfähig werden können [243]. Diese "adaptierten" Mutanten sind in der Lage, NADH über einen Malat-abhängigen Stoffwechselweg mit einer Geschwindigkeit zu oxidieren, die der des Wildtyps gleichkommt.

2. Raumstruktur Pyridinnucleotid-abhängiger Dehydrogenasen

Als C. Brändén und M. Rossmann 1969 auf dem ersten Konstanzer Treffen über "Pyridinnucleotid-abhängige Dehydrogenasen" auf Grund grober Auflösungsdaten von Aufnahmen der Elektronendichte an der Alkohol-Dehydrogenase der Leber und der Lactat-Dehydrogenase erste bemerkenswerte Ähnlichkeiten zwischen den Untereinheiten zweier NAD-bindender Dehydrogenasen entdeckten [244], waren in unserem Labor strukturelle Untersuchungen an der α GPDH aus Kaninchenmuskel seit geraumer Zeit im Gange [245]. Als diese Arbeiten kurz vor ihrem Abschluß standen, im Jahre 1977, traf man sich zum zweiten Symposium in Konstanz [246]. Durch Korrelation der in diesen acht Jahren angesammelten Sequenzierungs- und Röntgendaten von einigen intensiv erforschten Dehydrogenasen ließ sich deutlich folgendes gemeinsame Bauprinzip erkennen [246,247]:

- Jede Untereinheit besitzt mindestens 2 Domänen: eine Dinucleotid-bindende und eine katalytische Domäne (Abbildung 3).
- Die Position der Dinucleotid-bindenden Domäne innerhalb der kompletten Peptidkette ist variabel.
- Die Zahl der Aminosäuren pro Domäne differiert von Protein zu Protein innerhalb enger Grenzen (ca. 150 Reste).

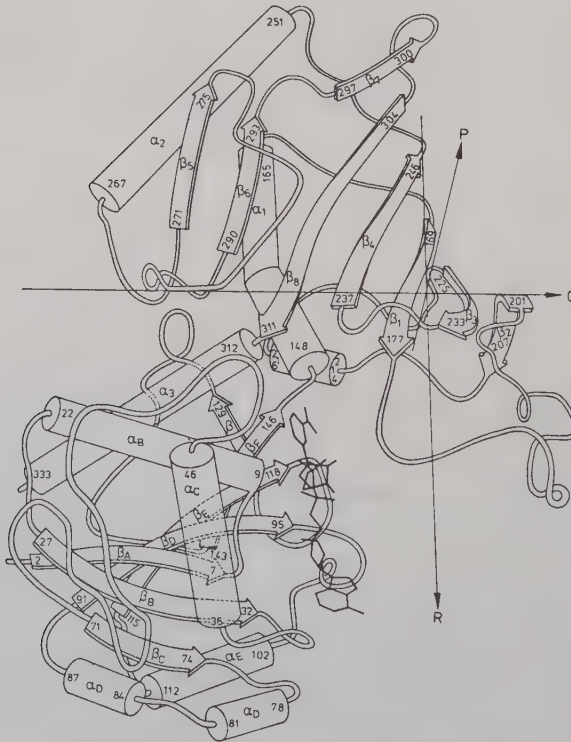


Abbildung 3 Faltungsdiagramm einer Untereinheit der D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* [248]

Die untere Domäne bindet NAD(H) - in der Zeichnung durch dickere Linien hervorgehoben -, die obere Domäne bindet das Substrat.

- Die Dinucleotid-bindende Domäne läßt sich in 2 Mononucleotid-bindende Strukturen (A_1, A_2) unterteilen, von denen jede aus 3 parallel verlaufenden Strängen eines β -Faltblattes besteht (A_1 mit $\beta A, \beta B, \beta C$; A_2 mit $\beta D, \beta E, \beta F$). Diese sind durch grob parallele α -Helices miteinander verbunden (Abbildung 4).
- Das Coenzym NAD(H) wird in einer geknickten Konformation gebunden. Der AMP-Anteil bindet an die Carboxy-Termini der Stränge $\beta A, \beta B, \beta C$, wobei das Adenin in einer unspezifischen, hydrophoben Tasche zu liegen kommt. Der Nicotinamid-Anteil bindet an die Carboxy-Termini der Stränge

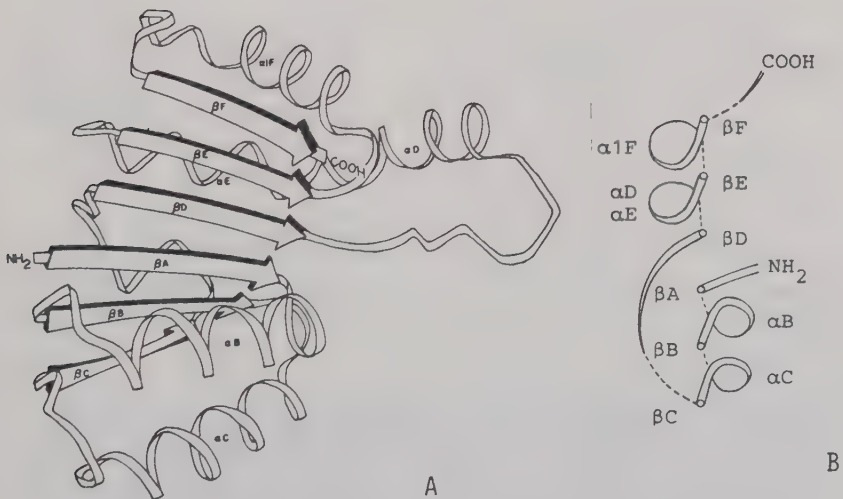


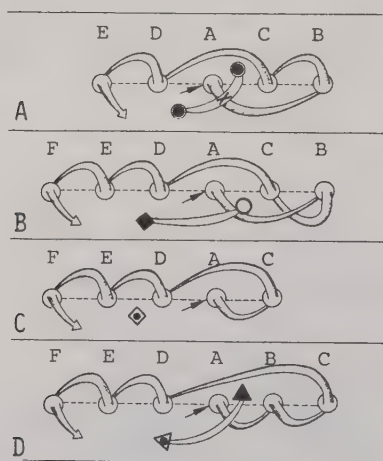
Abbildung 4 Schematische Darstellung der NAD-Bindungs-region in Dehydrogenasen [246]

- A Das 6-strängige β -Faltblatt liegt in der Papierebene, senkrecht zur Sehachse des Betrachters.
- B Das 6-strängige β -Faltblatt wurde um 90° aus der Papierebene gedreht, sodaß die Amino-Termini des Faltblatts dem Betrachter zugewendet sind und die Sehachse mit der Richtung der Peptidstränge zusammenfällt.

$\beta D, \beta E, \beta F$ und befindet sich mit Ausnahme seiner reaktiven Gruppe ebenfalls in einer hydrophoben Umgebung.

Bei räumlicher Superposition verschiedener Dehydrogenasen ist die Position des Coenzyms innerhalb der Dinucleotid-bindenden Domäne im wesentlichen konstant.

- Es besteht eine Tendenz für negativ geladene Reste an den C-terminalen Enden der Stränge des β -Faltblatts und für



ADENYLATKINASE (A)

- hydrophobe Taschen; vermutl. Bindungsstelle für Adenin
- × Position d. Phosphats

SUBTILISIN (B)

- katalytisches Zentrum
- ◆ hydrophobe Tasche, Bindungsstelle f. aromatische od. apolare Seitenkette

FLAVODOXIN (C)

- ◇ Bindungsstelle für FMN

NAD-abhängige DEHYDROGENASEN* (D)

- ▲ Bindungsstelle für AMP
- ◄ Bindungsstelle für NMN

Abbildung 5 Topologische Verwandtschaft funktionell unterschiedlicher Proteine mit β -Faltblättern [249]

Im Fall der Adenylkinase stellen die 5 in einer Ebene liegenden Ringe die 5 Stränge des β -Faltblatts dar. Blickrichtung ist entlang seiner Peptidketten. Ihre Carbonylenden zeigen zum Betrachter. Die Pfeile geben die Richtung der Polypeptidkette an, d.h. die Stränge ABCDE im Faltblatt sind entlang ihres Verlaufs in alphabetischer Folge angeordnet.

Die Faltblatt-Topologien der anderen Proteine wurden entsprechend dargestellt. * für LDH, s-MDH, LADH und GAPDH: die Topologie ihrer NAD-bindenden Domänen ist identisch. Die gleiche Topologie dürfte auch in der Phosphoglyceratkinase anzutreffen sein.

Die Substrate (●, ◆), Cosubstrate (◇, ▲, ◄) und katalytischen Zentren (○, ×) liegen vor den Carbonylenden der zentralen Stränge des Faltblatts, d.h. über der Papierebene.

positiv geladene Reste an Position 2 der β -Sequenzen.

- Die β -Sequenzen enthalten streng konservative Reste, z.B. Gly-28, -30, -33, -99, Asp-53 etc. (LDH-Numerierung).
- Die katalytischen Domänen der Dehydrogenasen sind in Sequenz und Konformation unterschiedlich; Reste am aktiven Zentrum bevorzugen jedoch gewisse räumliche Konstellationen. An NAD-bindenden Dehydrogenasen (bes. GAPDH), Cystein- und Serin-Proteasen wird strukturelle Konvergenz in den katalytischen Bereichen sichtbar.

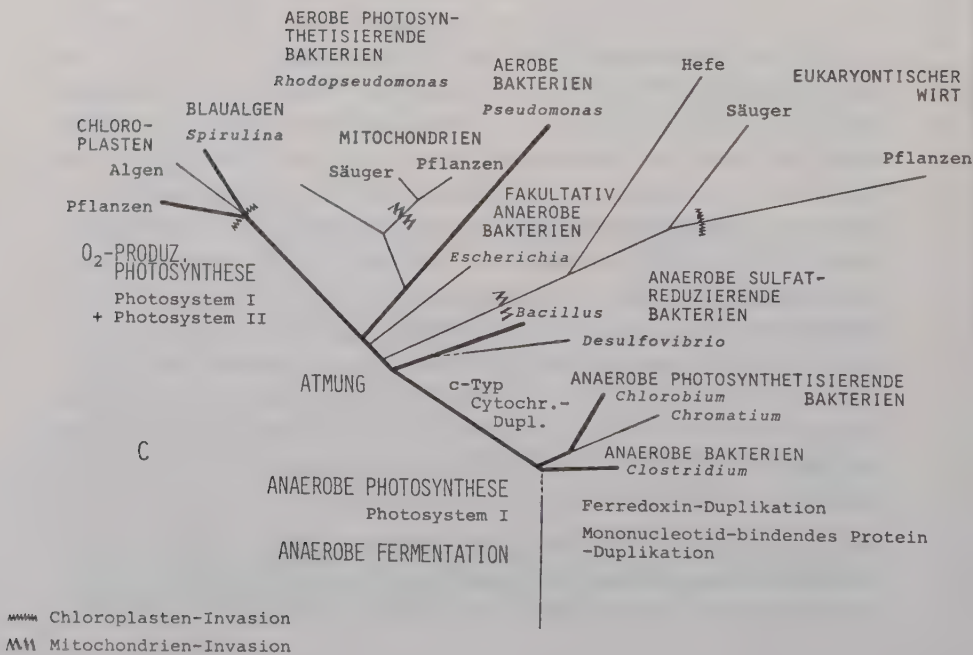
Bemerkenswerterweise zeigen funktionell unterschiedliche Proteine, wie Adenylatkinase (EC 2.7.4.3.) [249-251], Phosphoglyceratkinase (EC 2.7.2.3.) [252-254], Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11.) [255], Hexokinase (EC 2.7.1.1.) [256-258], Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40.) [259], Glycogenphosphorylase a (EC 2.4.1.1.) [260,261], Subtilisin (EC 3.4.21.14.) [262-264], Flavodoxin [265-269], Rhodanese (EC 2.8.1.1.) [270,271], Glutathionreductase (EC 1.6.4.2.) [272], Dihydrofolatreductase (EC 1.5.1.3.) [273,274] und L-Arabinose-bindendes Protein (*E. coli*) [275,276], eine Faltungsgeometrie, die der NAD-bindenden Dehydrogenasen [61d,62k,63n,246,247,277-282] stark ähnelt (Abbildung 5). In einigen Fällen, z.B. bei der Hexokinase, der Pyruvatkinase und der Dihydrofolatreductase, gleicht zwar die räumliche Anordnung, nicht aber die topologische Sequenz der β -Stränge und α -Helices der $(\beta\alpha\beta)_2$ -Struktur der NAD-Bindungsregion der Dehydrogenasen. Die Existenz eines $\beta\alpha\beta$ -Paares in Proteinen, das dem von α -Helices flankierten β -Faltblatt der Dehydrogenasen geometrisch ähnlich, in der Sequenz der Sekundärstrukturelemente entlang der linearen Polypeptidkette aber zu diesem unterschiedlich ist, könnte darauf hinweisen, daß die $\beta\alpha\beta$ -Struktur eine bevorzugte und vielleicht einzigartige Bindungsstruktur für Mononucleotide darstellt, auf die hin Segmente von Proteinen unterschiedlicher Herkunft im Laufe der Evolution konvergiert sind [283-288].

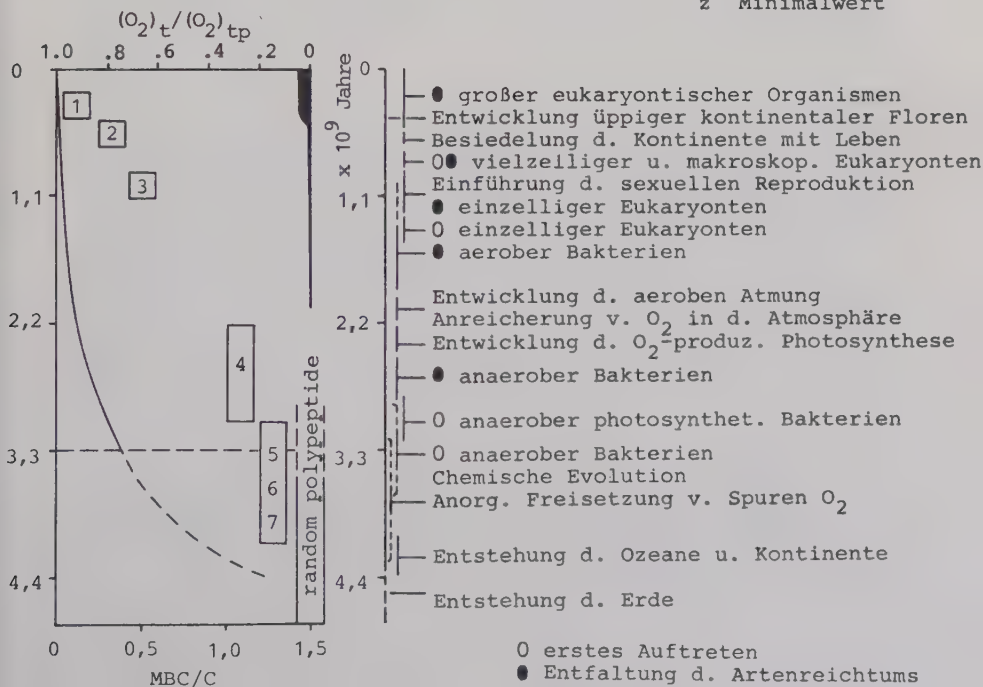
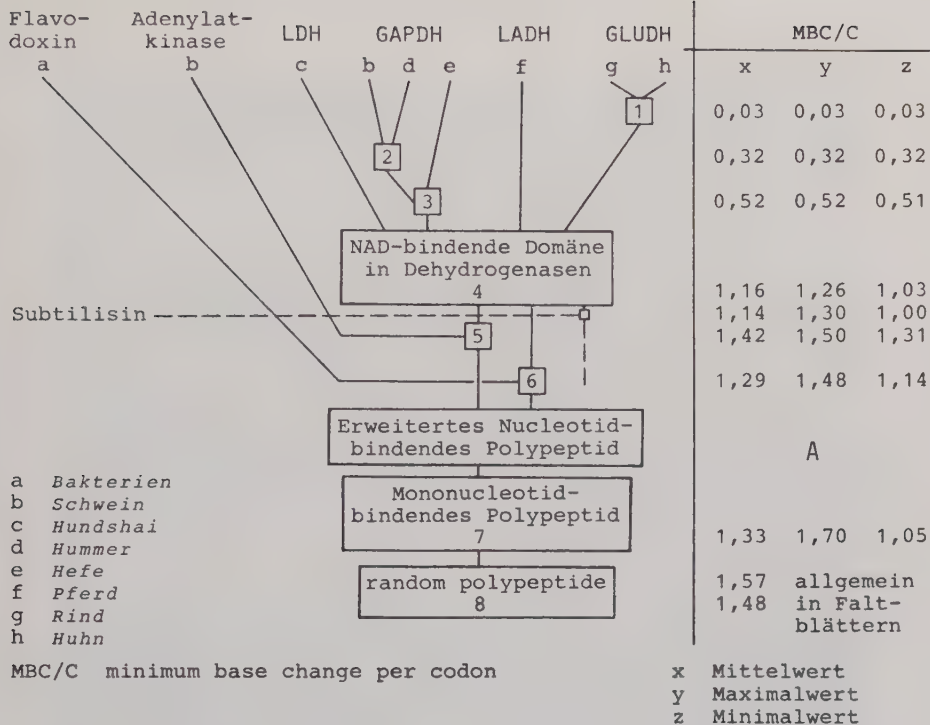
Die Ergebnisse der Strukturvergleiche an Dinucleotid-bindenden Dehydrogenasen stützen die Hypothese, daß die komplette NAD-Bindungsdomäne durch Duplikation eines Stücks DNA entstanden

Abbildung 6 Evolution der Dinucleotid-bindenden Domäne in Dehydrogenasen

- A Erweiterung eines auf kristallographischen Befunden beruhenden Stammbaums NAD-bindender Dehydrogenasen [289] auf der Grundlage von Minimum Base Change per Codon (MBC/C)-Werten aus Vergleichenden Rossmann-Faltungen enthaltender Proteine [nach 246,290]
- B Projektion postulierter Entwicklungsstufen der Nucleotid-bindenden Struktureinheit auf eine auf Fossilien-datierungen, anorganisch-geologischen Untersuchungen und vergleichenden Studien von Stoffwechsel und Biochemie heutiger Organismen basierenden Zeitskala und ihre Beziehung zu Marksteinen der Evolution des Lebens im Präcambrium [nach 246,291,292]
- C Korrelation eines aus den Aminosäuresequenzen von Ferredoxinen und c-Typ-Cytochromen und den Basensequenzen von 5 S ribosomalen RNAs abgeleiteten Stammbaums der Pro- und Eukaryonten mit dem in B skizzierten zeitlichen Aufriß der Evolution der NAD-bindenden Domäne von Dehydrogenasen [nach 293,294]

Weitere Erklärungen aus S.38





zu Abbildung 6 B:

Im Diagramm ist neben postulierten Entwicklungsstufen der Dinucleotid-bindenden Domäne die Entwicklung des stationären Reservoirs an photosynthetisch produziertem O_2 als Funktion der Zeit graphisch dargestellt.

$(O_2)_t = O_2\text{-Reservoir zur Zeit } t$

$(O_2)_{tp} = O_2\text{-Reservoir zur Zeit } tp \quad (tp = 4,5 \times 10^9 \text{ Jahre})$

Die im rechten oberen Teil des Diagramms eingezeichnete Kurve beschreibt den aus paläontologischen und geologischen Proben abgeleiteten Anstieg freien Sauerstoffs im Atmosphäre-Ozean-System. Auf dieses entfallen ca. 5% des heutigen O_2 -Reservoirs; die restlichen 95% sind in Fe_2O_3 (ca. 39%) und SO_4^{2-} (ca. 56%) gebunden. Das Ansteigen des O_2 -Partialdrucks als Ergebnis der Verwendung von H_2O als Reduktionsmittel bei der Photoreduktion von CO_2 ("the non-plus ultra in bioenergetic expediency", E. Broda, 1975 [295]) dürfte letztlich die "Erfindung" der aeroben Atmung ausgelöst haben, die eine der wesentlichen energetischen Voraussetzungen zur Evolution aller höheren Lebensformen darstellte.

zu Abbildung 6 C:

Die von jeder der 3 Großfamilien (Ferredoxine, c-Typ-Cytochrome, 5S ribosomale RNAs) abgeleiteten Stammbäume wurden so dimensioniert, daß sich vergleichbare Abschnitte überlappen. Eine kombinierte Matrix von Abständen wurden für die 6 Species berechnet, die in mehr als 1 Stammbaum vertreten sind. Die starken Linien repräsentieren den mit Hilfe der kombinierten Matrix errechneten Stammbaum. Die schwächeren Linien repräsentieren Zweige eines einzelnen Stammbaums nach Übertragung auf den kombinierten Stammbaum.

ist, das für eine einzelne Mononucleotid-Bindungsfläche kodierte, und daß starke funktionelle Zwänge in der darauffolgenden Evolution eine strikte Homologie in den Aminosäuresequenzen der beiden Teilflächen erhalten haben. Hinsichtlich ortsspezifischer Aminosäureaustausche sind die durchschnittlichen Minimum Base Change per Codon (MBC/C)-Raten [296] als Maß evolutionärer Abstände für die Dinucleotid-bindenden Domänen (Abbildung 6) gegenüber denen der katalytischen Domänen deutlich reduziert.

Das Phänomen der wahrscheinlich über 3 Milliarden Jahre dynamisch erhaltenen, homologen Sequenzen im Coenzym-bindenden Bereich der Dehydrogenasen, "lebende Fossilien" im Sinne M. Dayhoff's und R. Schwartz's [294], veranlaßte G.W.R. Walker [297]

durch Schritt-für-Schritt-Vergleiche zwischen Sequenzen, die mehrere zeitlich aufeinanderfolgende Divergenzperioden abdecken, "precursors" zu identifizieren, d.h. Aminosäuren, die jeweils vor einer Divergenz in die Sequenz kodiert waren. Er begann mit Species-Vergleichen für eine bestimmte Dehydrogenase (GAPDH, GluDH, LADH), verglich dann die erhaltenen Species-Divergenz-Precursors für verschiedene Enzyme und/oder "single-sample"-Repräsentanten und definierte Gruppen-Precursors für Dehydrogenasen, Flavodoxine und Vertreter einer gemischten Gruppe (Adenylatkinase, Subtilisin). Aus dem Vergleich der Gruppen-Precursors resultierten Aminosäuren, die die Ur-Dinucleotid-Bindungsfläche konstituiert haben könnten. Der Precursor-Vergleich zwischen den beiden Mononucleotid-Bindungsstrukturen führten zur Identifizierung von Aminosäuren, welche die von Rossmann u. Mitarbeitern postulierte Ur-Mononucleotid-Bindungsfläche bildeten, d.h. die Ur- $\beta\beta\beta$ -Struktur vor dem Ereignis der Genduplikation vor mehr als 3 Milliarden Jahren [246,290]. Das Verfahren der Precursor-Identifizierung basierte dabei ausschließlich auf der von Walker geringfügig modifizierten Aminosäuren-Basen-Beziehung des genetischen Code.

Während Rossmann annimmt, daß die Sequenz der Ur-Mononucleotid-Bindungsstruktur (21 Aminosäuren) aus einem "random polypeptide" entstand, machte Walker den interessanten Versuch, durch Postulierung einer noch früher abgelaufenen Gentriplikation ein 7 Aminosäuren umfassendes Ur-Ur- β -Peptid als Vorläufer der Ur-Mononucleotid-Bindungsstruktur abzuleiten:

	1	2	3	4	5	6	7
β	D	I	V	V	L	I?	?
	8	9	10	11	12	13	14
β	E	IK	V	DV?	IV	V	D
	15	16	17	18	19	20	21
β	V?	AT	IV	IV	A	I	EG
β	D/E	IT(V)	V	V	V	IV	D/E,G

Demnach wären die Aminosäuren Valin und Asparaginsäure/Glutaminsäure die frühesten Precursors in der "Ontogenese" der Dinucleotid-Bindungsdomäne. Walker's Überlegungen schließen aber die Möglichkeit des Einbaus anderer Aminosäuren in andere primordiale Peptidsequenzen nicht aus.

Schließlich kommt er, sehr spekulativ, zu dem Schluß, daß sich die früheste Dehydrogenasen- und Flavodoxin-Sequenz (vor ca. $1,5$ bis $3,2 \times 10^9$ Jahren) mindestens aus den Aminosäuren

A D E F G I K L (UUN und CUN) N Q R (AGN) S (UCN
oder AGN) T V Y (N=U,C,A,G)

konstituierte, während sich die früheste Dinucleotid-bindende Struktur (vor mehr als 3×10^9 Jahren) auf den Satz

A D E G I L N T

reduzierte.

Bemerkenswert an Walker's Experiment in "molekularer Paläontologie" ist, daß es trotz seines etwas spekulativen Charakters und der für eine derartige Analyse sehr geringen Zahl an geeigneten Sequenzen zu Schlüssen führte, die mit jüngeren Hypothesen über frühe genetische Kodierung und Studien, die sich mit Aminosäuresubstitution beschäftigen, streckenweise erstaunliche Übereinstimmungen erkennen lassen [298-300].

Die Primärstruktur der α GPDH aus Kaninchenmuskel wurde untersucht, weil

1. ihre Kenntnis Voraussetzung ist für eine eindeutige und endgültige Klärung der Frage, ob Skelettmuskel- und Leberenzym chemisch identisch sind.
2. sie die erste, komplette Aminosäuresequenz einer α GPDH überhaupt darstellt.
3. ihre Kenntnis eine umfassende Untersuchung der chemischen und phylogenetischen Verwandtschaft mit anderen NAD-abhängigen Dehydrogenasen ermöglicht (Bestimmung von Sequenzhomologien; Einordnung in den evolutionären Stammbaum der Dehydrogenasen).
4. ihre Kenntnis die Aufklärung der Raumstruktur, um die sich ein Arbeitskreis um M. Rossmann bemüht, wesentlich erleichtert. Von dem Vergleich der Röntgenstruktur der α GPDH mit der anderer NAD-abhängiger Dehydrogenasen und nucleotidbindender Proteine erwarten wir uns Auskunft über Existenz und Ausmaß gemeinsamer Strukturelemente.
5. diese Dehydrogenase ein hinsichtlich Funktion und Regulation außerordentlich interessantes und wichtiges Enzym darstellt.
6. sie sich nach Größe und Zusammensetzung für unsere damals junge proteinchemische Gruppe als Modellprotein zur Erprobung und Optimierung von Sequenzierungsmethoden und -strategien zu eignen schien.

B.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Untersuchung der Reinheit und Integrität der α GPDH in kommerziellen Präparaten

Zu Beginn der Strukturarbeiten an verschiedenen Chargen durchgeführte Aminosäurenanalysen und ihr Vergleich mit einer Bezugsanalyse [245] dokumentierten reproduzierbar konstante Ergebnisse. In einer von einer Mitarbeiterin einmalig durchgeführten Cellogel-Elektrophorese des Enzymproteins bei pH 6,5 und 8,6 und einer SDS-Gelelektrophorese lief es als einheitliche Bande [301]. Fortan bezogene Präparate wurden deshalb ohne erneute Homogenitätskontrollen zur Sequenzanalyse eingesetzt.

Eine erneute Untersuchung des Ausgangsmaterials erschien jedoch unerlässlich, als sich gegen Ende der Sequenzierungsarbeiten zwischen der Summe der in Sequenzen vergebenen Aminosäuren und deren Gesamtzahl pro Untereinheit (ca. 350 Reste) eine Differenz von minus 30-50 Resten abzeichnete. Da nach Bromcyanspaltung präparativer Mengen Proteins aus verschiedenen, nicht mehr auf ihre Homogenität hin untersuchten Chargen von 9 erwarteten Fragmenten ebenso viele isoliert und charakterisiert werden konnten, war der Schluß zu ziehen, daß die noch nicht vergebenen Aminosäuren auf mindestens ein Peptid zu beziehen sind, welches bei der Reinigung des Enzyms oder während seiner Lagerung durch proteolytische Aktivität, oder bei späteren Manipulationen auf chemischem Wege abgespalten und verloren gegangen sein mußte.

Von 3 verarbeiteten α GPDH-Chargen (S. 144) waren Aliquots der Original-Kristallsuspension bei 4°C aufbewahrt worden, sodaß an sämtlichen folgende Untersuchungen nachträglich durchgeführt werden konnten:

- 1) Polyacrylamid-Gelelektrophorese in denaturierendem Medium (SDS) [302-304] zur Kontrolle des Molekulargewichts und Detektion großer Spaltpeptide
- 2) Acetylcellulose-Elektrophorese in denaturierendem Medium (Harnstoff) [304,305] zur Kontrolle der Ein-

In der Kieselgel-Dünnschichtchromatographie traten die Banden x und y (Skizze zur Tabelle 3) bei allen 3 Chargen auf. Die Substanzen wurden eluiert, hydrolysiert, und in der Aminosäurenanalyse untersucht (Tabelle 3). Wie ein Vergleich ihrer Werte mit dem Leerwert zeigt, handelte es sich nicht um Peptide.

Substanz	x $R_f=0,3$	y $R_f=0,6$	Leerwert	P.E. nMol	DC
Asx	156	114	160	240	
Thr	72	53	80	243	
Ser	321	240	296	284	
Glx	313	263	272	235	oooo y
Pro	22	24	+	61	
Gly	340	272	360	267	-----
Ala	137	130	152	270	
Val	77	61	108	249	
Met	19	+	+	238	xxxx x
Ile	60	41	56	250	
Leu	119	70	144	252	
Tyr	50	28	64	232	
Phe	44	33	50	233	↑ xxxx αGPDH

Tabelle 3 Aminosäurenanalysen der Substanzen x und y aus dem Dünnschichtchromatogramm der αGPDH-Charge C

Die Zahlen stellen die mit einem Planimeter erfaßten Peakflächen aus den Aminosäurechromatogrammen der aus 1 cm² Plattenfläche eluierten Substanzen dar (P.E. = Planimeter-Einheit, dimensionslos).

Die Bande x war unmittelbar nach Entwicklung der Platte im UV-Licht (350 nm) lokalisierbar und ließ sich durch Co-Chromatographie von NADH auf das Coenzym oder eines seiner Zerfallsprodukte beziehen. Ob das über der Auftragsstelle (in Höhe der Pfeilbasis, Skizze zur Tabelle 3) in der Bande des denaturierten Proteins emittierte Licht gebundenes Nucleotid anzeigt, ist nicht sicher. Man würde nämlich erwarten, daß dieses bei Denaturierung des Proteins durch das Fließmittel quantitativ abgetrennt wird.

Bei Fluorescamin-Anfärbung [307-309] war über beiden Banden auf gelblichem Hintergrund Fluoreszenzlösung zu beobachten. Der Beitrag der ε-NH₂-Gruppen des Proteins zur Fluoreszenzin-

tensität kann gering sein [310], außerdem sind die N-Termini des Enzyms blockiert [4].

Nach weiterer Behandlung des Chromatogramms mit dem Chlor/o-Tolidin-Reagens [311] färbte sich neben dem Protein und der Substanz x auch die Substanz y an. Bei ihr dürfte es sich ebenfalls um ein Zerstörungsprodukt des Coenzyms gehandelt haben.

Bei der an 2 nMol Enzym-Untereinheit mit der Dansyltechnik durchgeführten Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren war im Fall der Chargen A und B das Ergebnis negativ. Bei Charge C fand sich auf der Position von Dns-Pro schwache Fluoreszenz. Die 24-60-120h-Werte der Aminosäureanalysen schonend entsalzter α GPDH aus allen 3 Chargen lieferten beim Vergleich mit der Bezugsanalyse keinen Hinweis auf ein Defizit an Aminosäuren. Der nach Präzipitation des Proteins auf Biogel P-2 chromatographierte Überstand enthielt weder Peptide noch Aminosäuren.

Ergebnis: Die bei den präparativen Ansätzen verwendeten kommerziellen Enzym-Chargen A,B,C waren nach den genannten Kriterien homogen und enthielten keine Spaltpeptide.

Obwohl das festgestellte apparente Molekulargewicht um ca. 3000 bis 4000 unter dem erwarteten Wert lag, wurde diesem Befund im Lichte der übrigen Ergebnisse kein großes Gewicht beigemessen. Die theoretische Möglichkeit des bereits vor Abfüllung der Suspensionen existenten Verlusts eines ca. 30 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Peptids wurde als unwahrscheinlich betrachtet: da die eingangs erwähnten, noch ausstehenden Sequenzen mit einer charakteristischen Aminosäurezusammensetzung assoziiert waren, hätte ihr Fehlen in der Aminosäurenanalyse des Restpeptids zum Ausdruck kommen müssen. Der Verlust eines C-terminalen Peptids war ausgeschlossen, da ein Bromcyanpeptid (D_2) zweifelsfrei als C-terminales Fragment identifiziert und sequenziert worden war.

2. Untersuchungen zur Säurestabilität modifizierter und unmodifizierter α GPDH

100% Ameisensäure und deren wässrige Gemische bis herab zu einer Konzentration von 30% sind ausgezeichnete Lösungsmittel für Polypeptide unterschiedlichster Zusammensetzung (z.B. Membranproteine, große Bromcyanfragmente). Denaturierte α GPDH, in üblichen Puffern nur schwer löslich (S.162), ging in konz. Ameisensäure oder Ameisensäure/Essigsäure-Gemischen ohne Schwierigkeit in Lösung. Dieses Verhalten veranlaßte uns, Ameisensäure in verschiedenen Konzentrationen als Elutionsmittel zur Säulenchromatographie einzusetzen. Um zu prüfen, ob und in welchem Ausmaß innerhalb einer definierten Zeit neben partieller Desamidierung von Säureamiden auch säurelabile Peptidbindungen gespalten werden, und um eine Erklärung für das Aminosäuren-Defizit (S. 42) zu erhalten wurde folgende Untersuchung angestellt:

α GPDH aus der Kristallsuspension (Charge D) wurde mit Aceton gefällt (I), wie im präparativen Ansatz aminoäthylisiert [312], erneut mit Aceton gefällt (II) und 2 Tage bei Raumtemperatur in 80% Ameisensäure inkubiert (III). Ein weiteres Aliquot α GPDH wurde nach Präzipitation in 80% Ameisensäure gelöst, 2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert (IV), wie im präparativen Ansatz aminoäthylisiert, über Sephadex G-50 fine in 80% Ameisensäure in 2 Tagen entsalzt und die Fraktionen einen weiteren Tag in der Säure belassen. Das unter dem Proteinpeak liegende Material wurde vereinigt (V) und zusammen mit den Kontrollen (I-IV) in der Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese untersucht. Zur Detektion kleinerer Spaltpeptide wurde der Bereich zwischen Proteinpeak und hinterem Ausschluß dünnsschichtchromatographiert, sowie in ausgewählten Proben mit der Dansyltechnik nach Fragmenten gesucht. Sämtliche Proben waren so bemessen, daß mit den verwendeten Nachweisreagentien Spaltpeptide und Aminosäuren in einer Menge von $\geq 10\%$ (Mol/Mol) der Ausgangsmenge an Protein nachweisbar wurden.

Die Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese ergab auf sämtlichen Bahnen ein identisches Bild: außer den α GPDH-Banden mit der bereits erwähnten Unschärfe (z.B. Abbildung 7) traten keine zusätzlichen Banden auf.

Die Dünnschicht-Analyse war negativ.

Von den dansylierten Proben ließen nur jene aus dem Maximum des Proteinpeaks eine sehr schwache Dns-Pro-Fluoreszenz erkennen (vgl. S. 46).

Ergebnis: Nach einer 5-tägigen Inkubation der α GPDH bzw. S-2-Aminoethyl-Cysteinyl (Aet)- α GPDH in 80% Ameisensäure bei Raumtemperatur trat eine acidolytische Spaltung der Polypeptidkette in einer Ausbeute von $\geq 10\%$ (Mol/Mol) der Ausgangsmenge nicht auf.

Spätere Untersuchungen zeigten, daß eine spezifische Bindung der α GPDH (- Asp - Pro -) durch längere Einwirkung von 80% Ameisensäure bei mittleren Temperaturen mit Ausbeuten bis zu 50% (Mol/Mol) gespalten wird [313,314].

3. Modifizierung der Cysteine mit Jodessigsäure oder Aziridin

Die Mercaptogruppe des Cysteins ist sehr reaktiv. Zu den häufigsten, meist ungewollten Reaktionen zählt die unter Einbeziehung eines weiteren Cysteinrestes ablaufende Oxidation durch Luftsauerstoff zum Cystin, die unter extremeren Bedingungen oder Einwirkung stärkerer Oxidantien über verschiedene Oxidationsstufen des Schwefelatoms zur Cysteinsäure führen kann; ferner die Mercaptidbildung mit Schwermetallionen und alle Reaktionen mit elektrophilen Agentien. Bei Proteinen mit S-S-Brücken kann es zum basenkatalysierten Disulfid-Austausch kommen, ein Vorgang, der die Bestimmung natürlicher Cysteine sehr erschwert.

Um diese unerwünschten und schwer kontrollierbaren Reaktionen zu vermeiden, ist, sofern die Lage von Disulfid-Brücken interessiert, auf Einhaltung saurer Lösungs- und Reaktionsbedingungen

gen zu achten. Bei der Sequenzbestimmung werden die Cysteine bzw. Cystine zu stabilen Derivaten umgesetzt, wie z.B. im vorliegenden Fall, mit Jodessigsäure [315] oder Aziridin [312, 316] zu Carboxymethyl (Cm)- bzw. Aminoethyl (Aet)-Derivaten.

Die Etikettierung mit radioaktiver Jodessigsäure erleichtert die Identifizierung Cys-haltiger Peptide während der chromatographischen Reinigung, sowie eine sichere und einfache Festlegung der Cys-Positionen beim sequentiellen Abbau. Mengenbestimmungen über die Radioaktivität jedoch erwiesen sich im Verlauf der häufig in stark saurem Milieu durchgeführten Peptidisolierung wegen partieller Abspaltung von markierter Thio-glycolsäure als nicht ausreichend zuverlässig. Radioaktive Peptide wurden deshalb in der Regel mit Hilfe der Aminosäuren-analyse quantifiziert.

Die durch Aminoethylierung entstandenen Sulfide dagegen zeichnen sich durch hohe Stabilität in Säuren und Basen aus. Die Reaktion läßt sich einfach und mit guter Ausbeute durchführen, schafft jedoch zusätzlich trypsinsensitive Peptidbindungen.

Die Cysteine der nativen α GPDH-Untereinheit wurden vor und nach Modifizierung mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) nach Ellman bestimmt [317]. Bei 3 verschiedenen Chargen (A,B,C) lagen die Werte, mehrfach gemessen, zwischen 8,4 und 9,4 Mol SH-Gruppen/Mol Untereinheit. Durch Inkubation mit Dithioerythrit (DTE) [318] oder Natriumborhydrid [319] konnten die Werte durchwegs über 9 Mol SH-Gruppen/Mol Untereinheit angehoben werden. Niedere Oxidationsstufen des Schwefelatoms sind häufig noch reduzierbar.

Nach Entsalzung einer α GPDH-Lösung durch Gelfiltration bzw. Ausfällung des Proteins mit Aceton wurde die Derivatisierung mit einem Überschuß an Alkylierungsreagens durchgeführt und die Vollständigkeit der Umsetzung nach Entsalzung des Produkts durch die Ellman-Reaktion kontrolliert. Sowohl nach Umsetzung mit Jodessigsäure als auch mit Aziridin waren keine freien SH-Gruppen mehr nachweisbar. Dieses Ergebnis wurde im Fall der Aminoethylierung durch die Aminosäurenanalyse des modifizierten Proteins bestätigt. Bei der sauren Hydrolyse von Cm- α GPDH

	24h		92h		120h		[169]	[13] [178]	[17]	[199] [200]	[29]
	a	b	a	b	a	b	c	d	e	f	g
Cys(O ₃ H)		9,4		8,8		7,2					
Cys(Cm)	+++	+++	+++	+++	+++	+++				7,5 / 7,9	0,0
Met(O)	28,0	27,1	26,4	27,3	25,6	25,8	28/31	23/23	24/24	37,0 ⁺ 1,7 / 35,7 ⁺ 1,6	24,4
Asx	13,6	13,1	13,2	12,8	12,6	12,1	14/15	14/13	14/13	15,1 1,3 / 13,4 0,9	13,8
Thr	11,5	11,7	11,0	11,0	10,0	9,7	14/17	14/15	11/13	8,8 1,1 / 10,6 0,9	13,2
Ser	42,7	42,0	41,1	40,7	40,0	39,6	42/42	26/33	33/37	30,0 2,2 / 29,6 1,4	22,8
Glx	14,9	14,8	13,7	13,8	13,6	13,5	16/17	12/12	13/12	9,1 1,6 / 11,6 0,9	10,4
Pro	37,3	38,0	35,7	36,3	35,0	35,4	40/35-	26/29	30/26	33,1 2,6 / 31,3 2,1	22,8
Gly	32,2	32,1	30,4	30,1	29,7	29,6	32/30-	22/22	22/19	27,1 2,7 / 26,2 1,7	30,7
Ala							10/-	9/ 7	10/ 9*		
Cys-2	20,7	21,7	26,2	28,0	27,5	29,3	27/23-	25/23	25/24	23,7 2,6 / 19,4 1,4	13,0
Val	6,6	6,1	0,0	1,5	0,2	0,1	9/ 5-	2/ 5	8/ 6	5,7 0,4 / 6,4 0,6	7,7
Met	19,7	20,6	24,6	26,0	25,1	27,1	26/23	21/18	22/24	17,8 2,3 / 18,4 1,4	10,8
Ile	28,5	28,5	28,0	28,2	27,7	27,8	28/32-	25/26	23/21	26,1 2,4 / 26,2 1,3	30,3
Leu	3,3	3,5	4,1	3,9	3,8	3,8	4/ 6	3/ 4	4/ 5	5,0 0,7 / 5,6 0,5	0,0
Tyr	13,9	14,0	13,7	14,0	14,1	14,2	15/14-	12/12	11/13	14,1 0,7 / 13,6 0,7	8,5
Phe	24,8	25,0	25,1	25,2	24,9	25,0	28/26	20/19	20/20	26,9 1,6 / 26,8 1,6	8,6
Lys											
Cys(Aet)	9,9	10,4	10,4	10,3	10,3						
His	9,2	9,0	8,7	8,4	8,5	7,8	9/ 8-	7/ 7	6/ 4	7,9 0,9 / 8,1 0,8	5,5
Arg	7,5	7,5	7,6	7,5	7,8	7,6	8/12-	8/ 8	6/12	9,3 0,4 / 9,2 1,1	15,9
Trp			nicht bestimmt				2/ 1-	2/ 2	2/ 2	2-3 / 2-3	3,9

Tabelle 4 Aminosäurenanalysen von a) Aet-αGPDH
b) Cm-αGPDH

und ihr Vergleich mit der Aminosäurezusammensetzung von αGPDHs verschiedener Species

c) Kaninchen	Skelettmuskel / Leber
d) Ratte	Skelettmuskel / Leber
e) Huhn	Brustmuskel / Leber
f) Drosophila melanogaster	αGPDH-1 / αGPDH-3
g) E.coli	EC 1.1.1.94

Die Angaben beziehen sich auf eine Enzym-Untereinheit.
Die Werte für Thr, Ser, Val, Ile sind nicht korrigiert.

* Cysteine/Untereinheit

wird Cystein teilweise regeneriert, was sich in den Cystin-Werten widerspiegelt (Tabelle 4).

Die Ausbeuten an Cys(Cm) in verschiedenen Präparationen betrugen 78-90%, die an Cys(Aet) 90-95% des theoretisch errechneten Wertes.

Die spezifische Radioaktivität zweier Ansätze von ^{14}Cm - αGPDH war 22 bzw. 19 Ci/Mol Untereinheit.

4. Bromcyanspaltung der alkylierten αGPDH und Auftrennung der Fragmente

Die Fragmentierung der linearen Polypeptidkette durch Bromcyan [320] empfiehlt sich aus folgenden Gründen:

- Methionin zählt zu den weniger häufig vorkommenden Aminosäureresten in Proteinen. In der αGPDH -Untereinheit sind 9 der ca. 350 Reste Methionine; eines bildet den C-Terminus. Aus der Bromcyanspaltung resultieren deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit auch längere Peptide. Ihre Aminosäuresequenz kann mit Hilfe automatischer Sequenzierungsmethoden in vielen Fällen ohne weitere Fragmentierung ermittelt werden.
- Die Reaktion läuft mit hoher Ausbeute ab.
- Als vorteilhaft, speziell für die Festphasen-Sequenzierung, erwies sich die Tatsache, daß der C-Terminus eines Bromcyanpeptids, mit Ausnahme des endständigen, Homoserin ist. Durch Behandlung mit wasserfreier Trifluoressigsäure kann man dieses in Homoserinlacton überführen, das mit primären Aminogruppen einer Festphase unter Bildung einer Säureamid-Bindung reagiert [321,322]. Auf diese Weise lassen sich Bromcyanpeptide über ihren C-Terminus selektiv und kovalent an Trägermaterial binden und in einem Solid-Phase-Sequencer abbauen.

Analytische Spaltversuche in Trifluoressigsäure bzw. 75% Ameisensäure unter sonst gleichen Bedingungen mit einem hohen Überschuß an Bromcyan ergaben, daß bei 12-stündiger Reaktionsdauer in der Ameisensäure eine höhere Spaltungsausbeute erhalten wird. Die eingetrockneten Spaltgemische waren vollkommen wasserlöslich und erlaubten die Verwendung eines Ammoniumacetat-Puffers als Elutionsmittel zur gelchromatographischen Auftrennung. Dieser Puffer interferiert weder mit der Absorption von Peptiden, deren Registrierung im Durchfluß selbst bei 220 nm noch möglich wird, noch kann er zur Acidolyse führen (Abbildung 9).

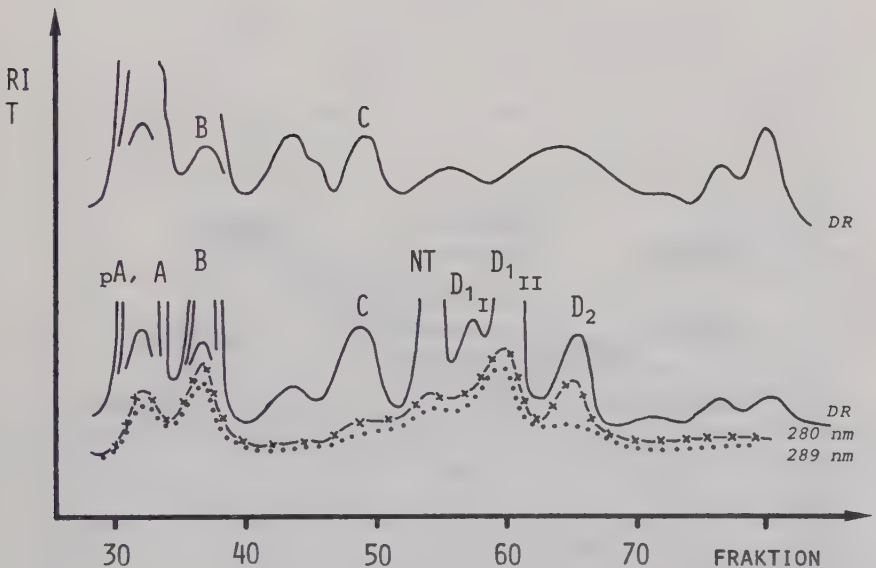


Abbildung 9 Primäre Auftrennung der Bromcyanpeptide der Aet- α GPDH (analytischer Ansatz)

Obere Kurve Bromcyanspaltung in Trifluoressigsäure (12h)
 Untere Kurve " " 75% Ameisensäure (12h)

Biogel P-10 (-400 mesh)
 0,4 x 150 cm
 0,05 M Ammoniumacetat pH 4,8
 0,54 ml/h

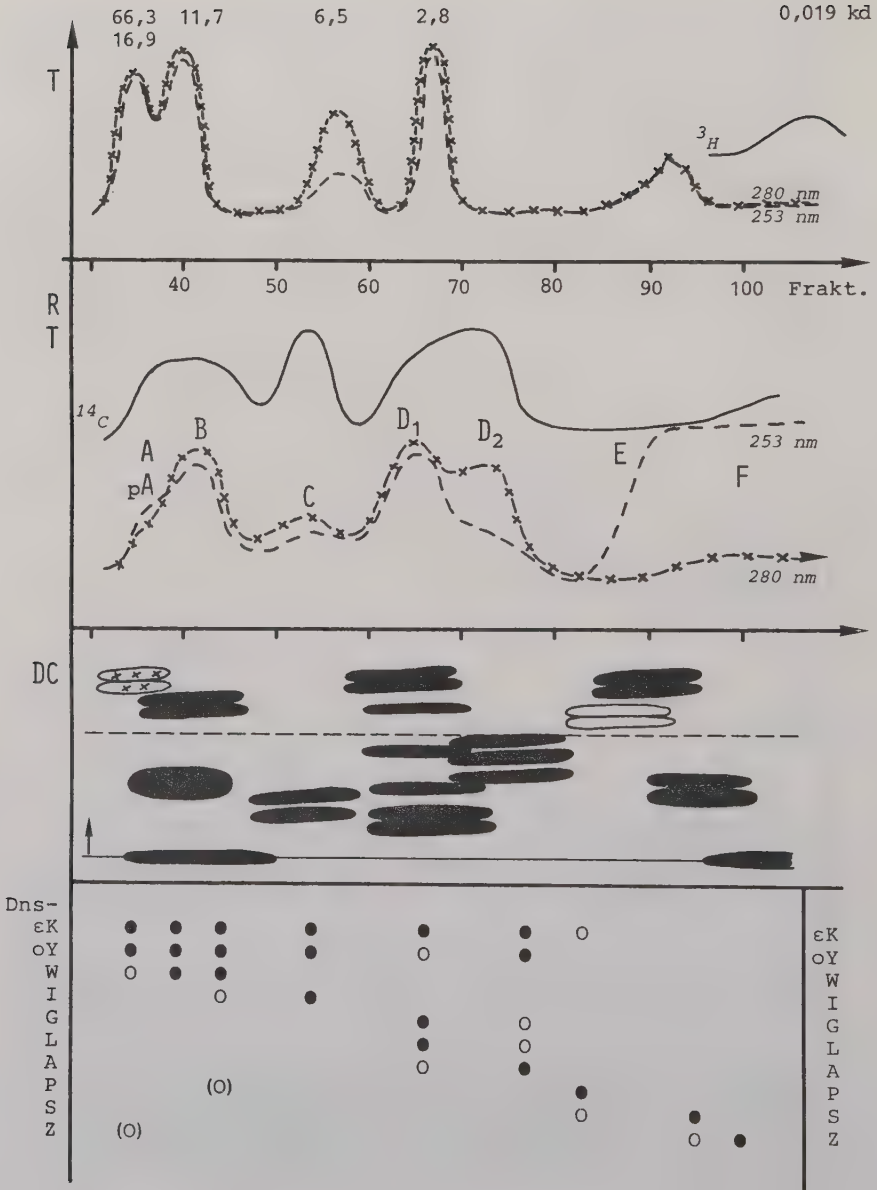


Abbildung 10

Abbildung 10

Oben Eichchromatogramm mit Polypeptiden bekannten Molekulargewichts und tritiiertem Wasser

Albumin	Rinderserum	66 300
Myoglobin	Pferdemuskel	16 900
Cytochrom c	Pferdeherz	11 700
Trypsininhibitor	Rinderpankreas	6 500
Mellitin	Honigbiene	2 800
Tritiumwasser		20

Laufbedingungen wie unter "Mitte"

Mitte Primäre Auftrennung der Bromcyanpeptide der ^{14}Cm - α GPDH (präparativer Ansatz)

Sephadex G-50 fine
1,2 x 207 cm
30% Ameisensäure
4,4 ml/h
30 min-Fractionen

Bromcyanspaltungen von Aet- α GPDH ergeben ein im wesentlichen gleiches Elutionsprofil (Abbildung 11).

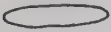
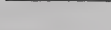
Unten Dünnschichtchromatographische Analyse der Fractionen aus der primären Auftrennung der Bromcyanpeptide der ^{14}Cm - α GPDH

Untersucht wurden 30 min-Fractionen in der Reihenfolge ihrer Elution. Behandlung mit Fluorescamin und Chlor/o-Tolidin.
Sehr schwach angefärbte und/oder nicht reproduzierbare Banden blieben bei der Aufzeichnung unberücksichtigt.

Endgruppenbestimmung nach der Dansyltechnik an Bromcyanpeptiden aus an Hand des Dünnschichtchromatogramms ausgewählten Fractionen

Symbolik

O mittelstarke bis schwache Fluoreszenz
● starke Fluoreszenz
εK ε-Dns-Lys
oY o-Dns-Tyr

 keine Anfärbung mit Fluorescamin (Fl)
 schwache Anfärbung mit Chlor/o-Tolidin (CT)
 extrem schwache Anfärbung mit (Fl)
 gute Anfärbung mit (CT)
 schwache Anfärbung mit (Fl) und (CT)
 mittelstarke Anfärbung mit (Fl) und (CT)
 sehr starke Anfärbung mit (Fl) und (CT)
 Differentialrefraktometrie (RI) oder Radioaktivitätsmessung (R)
 224 nm
 253 nm
 280 nm
 289 nm

Transmissionsmessung (T)

Alle Versuche, das im analytischen Ansatz erhaltene optimale Trennergebnis auch im präparativen Maßstab zu reproduzieren, scheiterten an der Schwerlöslichkeit der gewonnenen Bromcyanpeptide. Darüberhinaus waren Biogel P-10 - Batches von ähnlich hoher Qualität, wie sie während der analytischen Versuche zur Verfügung standen, nicht mehr erhältlich. Diese Umstände zwangen zur Verwendung von konzentrierter Ameisensäure als Elutionsmittel und Suche nach geeigneten Gelmatrices mit ausreichender Säurestabilität.

Die primäre Auftrennung präparativer Mengen an Bromcyanpeptiden erfolgte an Sephadex G-50 oder -75 fine in 30% Ameisensäure oder an Biogel P-30 (100-200 mesh) in 30, 50 oder 80% Ameisensäure. Das Eluat wurde nach Elutionsprofil, DC-Analyse und Endgruppenbestimmung in 8 Hauptfraktionen eingeteilt: prä-A, A, B, C, D₁, D₂, E und F (Abbildung 10).

Vom Ergebnis obiger Analysen wurde zunächst das Fragmentierungsschema a abgeleitet.

Erst wesentlich später wurde innerhalb des bis dahin der Isolierung entgangenen N-terminalen Bromcyanpeptids der αGPDH die säurekatalysierte Spaltung einer -Asp-Pro- Bindung entdeckt und die beiden Spaltprodukte identifiziert. Das lange Zeit als "echtes" Bromcyanfragment geführte Peptid 7 stellte sich als C-terminales Bruchstück jenes N-terminalen Bromcyanfragments heraus. Schema b berücksichtigt diese Korrektur:

	a	b
Peptid 1	Trp-----Met	Trp-----Met
2	Ile-----Met	Ile-----Met
3	Gln-----Met	Gln-----Met
4	Gly-----Met	Gly-----Met
5	Leu-----Met	Leu-----Met
6	Ala-----Met	Ala-----Met
<u>7</u>	<u>Pro</u> ---Met	<u>Ac-X</u> --- <u>Asp-Pro</u> ---Met
8	Ser---Met	Ser---Met
9	Glu-Met	Glu-Met

5. Isolierung und Sequenzierung einzelner Bromcyanpeptide

Um die während der Untersuchung schrittweise erreichte Verfeinerung in Strategie und Methodik der Isolierung und Sequenzierung von Bromcyanpeptiden zu verdeutlichen, wurde einer mehr chronologisch geordneten Darstellung der Ergebnisse der Vorzug gegeben.

5.1. Grobcharakterisierung der Hauptfraktion A

Die Fraktionen A und B wurden durch Rechromatographie auf Sephadex G-50 oder -75 fine in 80% Ameisensäure isoliert.

Die Fraktion A stellte ein Gemisch von mindestens zwei, wahrscheinlich aber mehreren Fragmenten aus unvollkommener Bromcyanspaltung dar (reproduzierbares Auftreten von Met und Met (O) in der Aminosäurenanalyse, Tabelle 4). Die Zusammensetzung der Fraktion sowie die relativen Mengenanteile der Komponenten wechselten von Präparation zu Präparation. Bei der Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren fand man entweder keine, oder nur Spuren von Leu. Die deutlich geringeren Ausbeuten an den Bromcyanpeptiden $D_{1/I}$, E_1 , B, E_2 und pA ließen vermuten, daß diese in Peptiden der heterogenen Fraktion A gebunden waren.

Bei primärer Auftrennung des Bromcyanspaltgemisches unter Verwendung 30-50% Ameisensäure fand sich in der Fraktion A auch das Bromcyanpeptid pA, welches in weniger konzentrierter Säure Aggregate bildete und, unabhängig von der gewählten Gelporosität, im Ausschlußvolumen eluiert wurde (Abbildung 10, Mitte).

5.2. Grobcharakterisierung der Hauptfraktion B

Die Fraktion B enthielt das größte Bromcyanpeptid der α GPDH, B, bestehend aus ca. 100 Aminosäureresten. Auffällig ist sein hohes Lys/Arg-Verhältnis (Tabelle 5). Die charakteristische

Fraktion A				B	
Cys (O ₃ H)		+	+++	+	
Cys (Cm)		0,15		1,58	1*
Met (O)	+				
Asx	4,83	2,77	3,14	9,79	10
Thr	2,26	1,20	1,62	2,26	2
Ser	1,98	0,99	0,75	3,00	2
Hse	++	+	+	++	1
Glx	5,62	3,37	3,76	10,11	10
Pro	1,71	1,50	1,06	6,26	7
Gly	4,45	3,42	3,83	10,63	11
Ala	4,79	2,63	3,09	8,50	7
Val	3,21	2,76	3,34	8,68	11
Met	+	+	+		
Ile	3,37	2,73	2,31	10,26	14
Leu	4,46	2,55	2,60	8,74	9
Tyr	0,96	0,25	+	0,84	1
Phe	1,97	1,08	1,30	3,00	3
Lys	4,03	2,61	2,40	10,89	11
Cys (Aet)	1,14				
His	1,41	0,67	0,50	4,58	5
Hse>	++	+	+	+	
Arg	1,36	0,52	0,74	0,53	

Tabelle 5 Aminosäurenanalysen von 3 verschiedenen Präparationen der heterogenen Fraktion A (50h) und des ungereinigten Bromcyan-peptids B (24h)

* nach [301]

Fleckenverteilung auf der DC-Platte nach Dansylierung des Peptids ließ am ehesten Trp als N-terminale Aminosäure vermuten, dessen Dns-Derivat bei der sauren Hydrolyse in mehrere fluo-reszierende Komponenten zerfällt.

Die Fraktion A und das Bromcyanpeptid B wurden in der Folge von Mitarbeitern unseres Arbeitskreises untersucht [301].

5.3. Isolierung und Sequenzierung der Bromcyanpeptide E₂ und E₃

5.3.1. Isolierung von E₂ und E₃

Die Auswertung der UV-Transmissionsprofile und Differentialrefraktionskurven primärer Auftrennungen am Molekularsieb allein erlaubte keine Aussagen über Vorhandensein oder Fehlen kurzer Bromcyanfragmente zwischen Peak D₂ und dem Ende der Trennzone (Hauptfraktion E, Abbildung 10, Mitte u. 11, Oben). Dieser Bereich wurde vom Peak der konzentrierten Ameisensäure überdeckt, die zur Lösung des Spaltansatzes verwendet wurde. Auch eine Rechromatographie von E in 1% wässrigem Pyridin gestattete keine Differenzierung zwischen peptidhaltigen und peptidfreien Fraktionen (Abbildung 11, Mitte). Drei bei DC-Analyse des Eluats aufgetretene, intensive Banden lieferten einen ersten Anhalt für die Existenz von Peptiden in dieser Zone. Erste Erfahrungen in der Dünnschichtchromatographie von Bromcyanpeptiden führten zu dem Schluß, daß es sich bei der ausgeprägten Doppelbande um ein einziges Peptid handeln müsse. Diese Annahme wurde durch die Aminosäureanalysen der Fraktionen a und b gestützt, nach denen am ehesten ein Bromcyanhexapeptid in Frage kam, während Fraktion c praktisch ausschließlich freies Cys(Aet) enthielt und auf Grund des Fehlens von Hse als weiteres Bromcyanpeptid ausschied (Tabelle 6).

Bei der Endgruppenbestimmung an Aliquots der Fraktionen a und b schließlich wurden anstelle der erwarteten einzigen N-terminalen Aminosäure, nämlich der des postulierten Hexapeptids, zwei gefunden: Ser und Glx. Damit war mit der Existenz von mindestens zwei Bromcyanpeptiden, E₂ und E₃, in der Hauptfraktion E der primären Auftrennung zu rechnen.

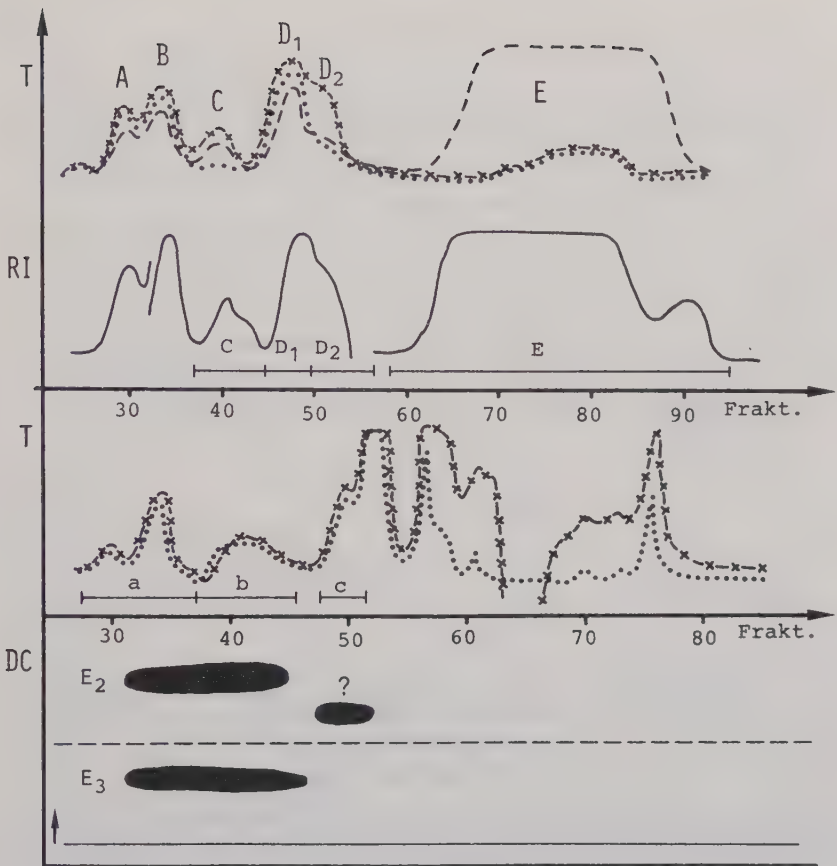


Abbildung 11

- Oben Primäre Auftrennung der Bromcyanpeptide der Aet-αGPDH
(präparativer Ansatz)
- Biogel P-10 (-400 mesh)
1,5 × 150 cm
50% Ameisensäure
6,0 ml/h
- Mitte Rechromatographie der Hauptfraktion E mit dünnschicht-
Unten chromatographischer Analyse des Eluats
- Biogel P-2 (-400 mesh)
0,6 × 150 cm
1% Pyridin
1,2 ml/h

Die Registrierung des Differentialrefraktionsindex (RI) lieferte keine zusätzliche Information.

5.3.2. Sequenzierung von E₂ und E₃

Die Fraktionen a und b (Abbildung 11, Mitte; Tabelle 6) wurden nach der Homoserinlacton-Koppelungsmethode [321] kovalent an Triethylentetramin (TETA)-Polystyrolharz [321] gebunden und nach Edman automatisch abgebaut [323].

Die Ergebnisse dieser Abbauten, am Beispiel der Fraktion b demonstriert (Abbildung 12), lieferten den Beweis, daß das vermeintliche Hexapeptid tatsächlich ein Gemisch zweier Komponenten darstellte, eines Tetra- und eines Dipeptids. Die gaschromatographischen (GC) und massenspektrometrischen (MS) Daten machten die Kombination 2 sehr wahrscheinlich:

Kombination 1 Glu - Val - Leu - Hse
 Ser - Hse

Kombination 2 Ser - Val - Leu - Hse E₂
 Glu - Hse E₃

Um die Kombination 1 auszuschließen, wurden die Abbauschritte 1-3 quantifiziert. Aus dem Vergleich der relativen Mengenanteile an Glx, Ser, Val und Leu nach Rückhydrolyse der Thiohydantoine zu den freien Aminosäuren (Tabelle 7, α) mit den relativen Mengenverhältnissen der genannten Aminosäuren in der Ausgangsanalyse (Tabelle 7, β; Tabelle 6) wurde die Ausgangshypothese bestätigt.

		Glx	Ser	Val	Leu	
Fraktion a	α	60	48	53	50	nMol
		1,00	0,80	0,88	0,83	rel. Verh. zahl
	β	177	95	130	130	nMol
		1,00	0,54	0,74	0,74	rel. Verh. zahl
Fraktion b	α	450	200	250	230	nMol
		1,00	0,44	0,56	0,51	rel. Verh. zahl
	β	1140	450	570	507	nMol
		1,00	0,40	0,50	0,45	rel. Verh. zahl

Tabelle 7

Schritt Identifizierung	1	2	3	4	5-8*
1. Gaschromatographie	S E	V	L	(L V)	Overlap
2. Massenspektrometrie	S E	V Σ (D I L)	n.i.	(L V)	
3. Rückhydrolyse und Quantifizierung durch Aminosäurenanalyse (nMol)	S 200 E 450	V 250 Σ +++	L 230		Kopplungs- ausbeute ca. 50%
<u>SEQUENZ</u> aus GC und MS allein				wahrscheinl.	S-V-L-Σ E-Σ
mit Berücksichtigung der quantifizierten Rückhydro- lyse		<u>nur</u>			S-V-L-Σ E ₂ E-Σ E ₃

Abbildung 12 Sequenzierung eines aus 2 Komponenten zu-
sammengesetzten Peptidgemisches (Fraktion
b aus der Hauptfraktion E)

n.i. nicht identifiziert
Σ Hse

* Die tatsächliche Länge eines Peptids läßt sich erfahrungs-
gemäß aus aminosäureanalytischen Daten allein nicht mit
voller Sicherheit bestimmen; der Gefahr, einen Abbau zu
früh abubrechen, wird durch Erweiterung der Zahl der Ab-
bauzyklen um 1-3 begegnet.

Tabelle 7 Ermittlung der richtigen Peptidkombination nach
Sequenzierung eines aus 2 Komponenten zusammen-
gesetzten Peptidgemisches (Fraktion a und b aus
der Hauptfraktion E, Abbildung 11) durch Ver-
gleich der Aminosäurenstoichiometrien aus den
Analysen vor (β) und nach (α) dem Abbau

Eine gleichzeitige Sequenzierung zweier Peptide hat nur dann Aussicht auf Erfolg, wenn ihr Mengenverhältnis deutlich $\neq 1$ ist und die repetitiven Ausbeuten über den gesamten Abbau hinweg einen weitgehend parallelen Verlauf aufweisen, was im allgemeinen gegeben ist. An Hand der quantitativen Abbaudaten der Fraktion a (Tabelle 7) allein wäre demnach eine sichere Bestimmung der entsprechenden N-Termini von E_2 und E_3 nicht möglich gewesen:

Fraktion a	$\frac{\text{Glx}}{\text{Ser}}$	(aus Rückhydrolyse) = $\frac{1}{0,88}$	(korrig. Werte)
Fraktion b	$\frac{\text{Glx}}{\text{Ser}}$	" "	= $\frac{1}{0,50}$

Auf der Suche nach leistungsfähigen Trennsystemen für kleinste Peptide wurde die Hauptfraktion E später häufig zu Testzwecken eingesetzt und die Bromcyanpeptide E_2 und E_3 wiederholt isoliert (Abbildung 14). Ein manueller Edman-Abbau bestätigte die Sequenz:

E_2	Ser-Val-Leu-Met
E_3	Glu-Met

Charakterisierung der Fraktion c (Abbildung 11, Mitte Tabelle 6):

In der Dünnschichtchromatographie verhielt sich die Substanz der Fraktion c wie Cys(Aet), ebenso bei der Endgruppenbestimmung und Aminosäurenanalyse. Wie bereits erwähnt, war ein Bromcyanpeptid Cys(Aet)-Hse wegen des fast vollständigen Fehlens von Hse und Hse> aber wenig wahrscheinlich.

Trotzdem wurde eine Homoserinlacton-Kopplung an TETA-Harz versucht und die Substanz über 3 Schritte abgebaut: in Schritt 1 fanden sich Spuren von Pro, in den Schritten 2 und 3 von Gly und Val. Ein Nachweis von Cys(Aet) gelang nicht. Da das Waschwasser der Kopplung verworfen wurde und auch keine Trägeranalyse vorliegt, kann über den Erfolg der Fixierung der Substanz

an das Harz keine Aussage gemacht werden.

Bemerkenswert ist, daß die Fraktion c bei der Aufarbeitung von Bromcyanspaltungen der Aet- α GPDH regelmäßig, der Cm- α GPDH jedoch nie erhalten wurde.

5.4. Isolierung und Sequenzierung des acidolytischen Spaltprodukts E₁

5.4.1. Isolierung von E₁

Das lange Zeit als "echtes" Bromcyanpeptid angesehene Fragment E₁ wurde durch Zufall entdeckt:

Beim Betrachten einer Fluorescamin-behandelten Kieselgelplatte mit dem Chromatogramm einer Hauptfraktion E unter der UV-Lampe hob sich nach Adaption der Augen an die Dunkelheit zwischen D₂ und E₂ eine bei früheren Präparationen nicht beobachtete dunkle Doppelbande vom intensiv gelben Untergrund ab (Abbildung 10, Unten). Dieser resultierte aus der Reaktion zwischen Fluorescamin und Ammoniak in höherer Konzentration [310] und tritt immer dann auf, wenn DC-Platten nach Entwicklung im ammoniakalischen Fließmittel nicht ausreichend lange unter einem Luftstrom gehalten werden. Die Vermutung, es handle sich bei der Bande um die Fluoreszenzlöschung eines Fluorescamin-negativen Peptids, wurde durch Endgruppenbestimmung bestätigt: sie ergab Pro, welches als sekundäres Amin keine Reaktion mit dem Spirolacton eingeht. Die Hauptfraktion E wurde rechromatographiert (Abbildung 13) und von der Fluorescamin-negativen Substanz eine Aminosäurenanalyse angefertigt (Tabelle 8). Nach ihr handelte es sich um ein Pentapeptid mit dem C-Terminus Hse.

Zur sicheren Erfassung sämtlicher Peptide unabhängig von Art und Zahl ihrer funktionellen Gruppen wurden DC-Platten fortan nach Anfärbung mit Fluorescamin routinemäßig mit dem Chlor/o-Tolidin-Reagens behandelt.

Hauptfraktion E
(Abbildung 10, Mitte)

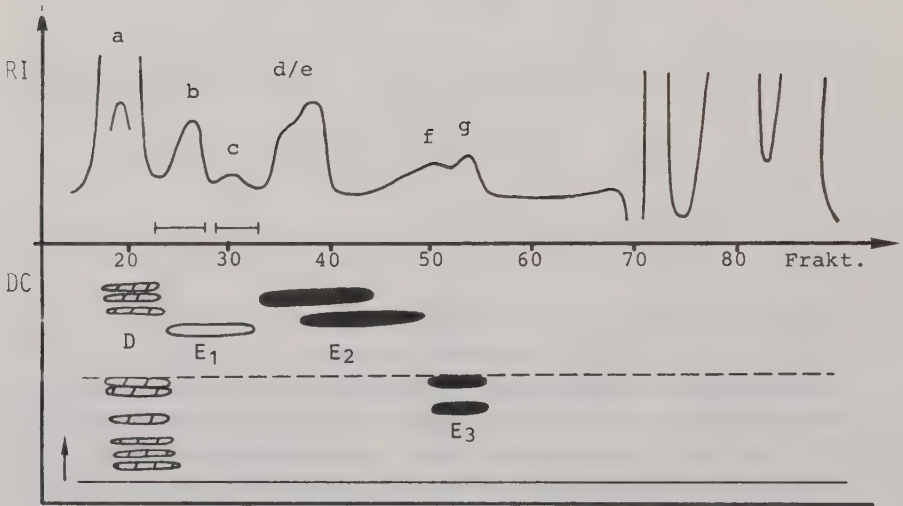


Abbildung 13 Rechromatogramm der Hauptfraktion E

Biogel P-2 (-400 mesh)
0,4 x 150 cm
10% Essigsäure
0,54 ml/h

Eine vollständige Auftrennung des E-Gemisches in die 3 Komponenten E_1 , E_2 und E_3 wurde später nach Optimierung der Trennbedingungen in einem einzigen säulenchromatographischen Schritt erreicht (Abbildung 14).

Abbildung 14 Rechromatogramm der Hauptfraktion E aus einer primären Auftrennung der Bromcyanfragmente der Aet- α GPDH (präparativer Lauf)

Biogel P-10 (-400 mesh)
0,5 x 150 cm
80% Ameisensäure
0,78 ml/h

Fraktion b			Fraktion c			
E ₁			E ₁	E ₂	X	
Asx	+		0,58		(1)	
Thr	1,00	1	0,92	1		
Ser	0,16		0,35		1	
Hse	+++	1	++++	1	1	
Glx	+		0,63		(1)	
Pro	0,91	1	0,72	1		
Gly	0,18		0,45		(1)	
Ala	0,16		0,75		(1)	
Val	0,91	1	1,47	1	1	
Ile	+		0,28		(1)	
Leu	+		0,35		1	
Tyr	+		0,35		(1)	
Phe	0,11					
Lys	+		0,26			
His	+		+			
Hse>	+++		+++			
Arg	0,83	1	1,00	1		
Gesamt		5		5	4	(4-6)
N-Term.		Pro		Pro	Ser	keine

Tabelle 8 Aminosäurenanalysen der Fraktionen b und c aus einer Rechromatographie der Hauptfraktion E (Abbildung 13)

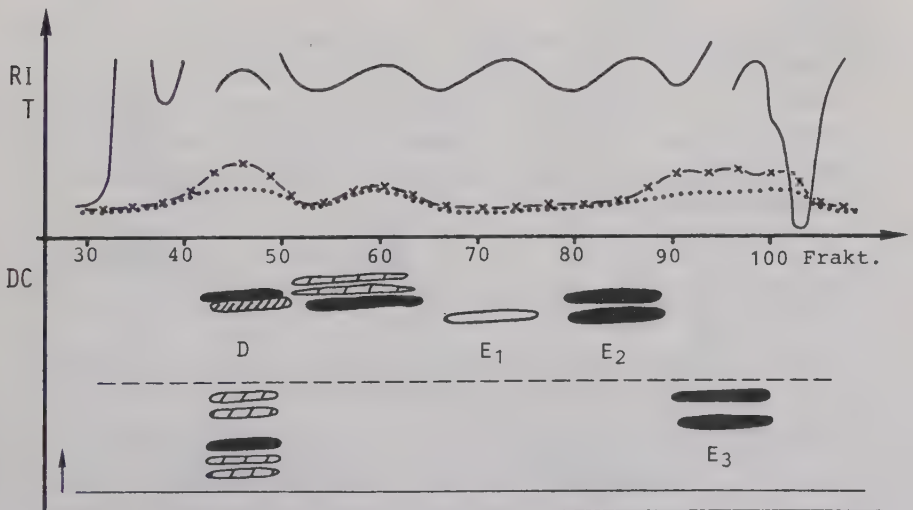


Abbildung 14

Daß E_1 kein "echtes" Bromcyanpeptid ist, sondern das C-terminale Fragment des acidolytisch gespaltenen N-terminalen Bromcyanpeptids der α GPDH, wurde von Mitarbeitern festgestellt. Von ihnen wurde das N-terminale Fragment (NT) auch präparativ hergestellt und sequenziert [314].

5.4.2. Sequenzierung von E_1

Das Pentapeptid aus Fraktion b (Abbildung 13; Tabelle 8) wurde über das C-terminale Hse> zu einer Hälfte an TETA-Polystyrolharz, zur anderen Hälfte an 3-Aminopropyl-Glas (APG) [324, 325] fixiert und nach Edman automatisch abgebaut. Die auch manuell bestimmte Sequenz lautete:

E_1	Pro-Arg-Val-Thr-Met
-------	---------------------

Die Kopplung an den Mischträger wurde wegen der erfahrungsgemäß besseren Kopplungsausbeute bei kleinen Peptiden durchgeführt.

Die Sequenzierung der heterogenen Fraktion c (Abbildung 13; Tabelle 8), die sich zu 75% aus E_1 und zu 25% aus E_2 zusammensetzte, bestätigte obige Sequenz. Die schwächere Komponente E_2 drang nur im ersten Abbauschritt mit Ser durch; die weiteren Positionen ließen sich wegen Unterschreitung der Nachweisgrenzen nicht mehr erfassen.

5.5. Isolierung und Sequenzierung des Bromcyanpeptids D_2

5.5.1. Isolierung von D_2

Das Profil der Transmissionskurven im Bereich der Peaks D_1 und D_2 beschrieb in charakteristischer Weise die Elution einer Trp-haltigen (D_1), gefolgt von einer Tyr-haltigen Komponente (D_2) (Abbildung 10, Mitte, u. 11, Oben). Das Dünnschichtchromato-

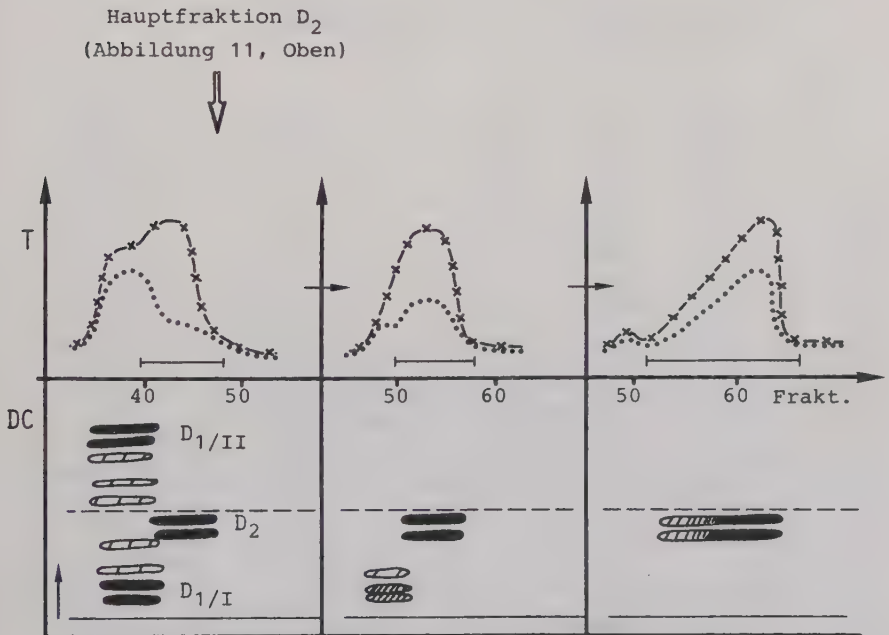


Abbildung 15 Rechromatogramme der Hauptfraktion D_2 aus der Bromcyanspaltung der Aet- α GPDH

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Li. Sephadex G-50 sf. | Re. Biogel P-10 (-400 mesh) |
| 0,8 x 150 cm | 0,6 x 150 cm |
| 0,1 M Ammoniumacetat pH 4,8 | 2% Essigsäure |
| 2,16 ml/h | 1,2 ml/h |
| Mi. Biogel P-10 (-400 mesh) | |
| 0,8 x 150 cm | |
| 0,1 M Ammoniumacetat pH 4,8 | |
| 2,16 ml/h | |

gramm des D_2 -Abschnitts zeigte neben einigen sehr schwachen 3 starke Banden. Diesen konnte Ala als N-terminale Aminosäure zugeordnet werden. Weitere, schwache Endgruppen ließen sich auf benachbarte Peptide beziehen (Leu, Gly, Pro). Die Emission des o-Dns-Tyr-Flecks erschien bei D_2 deutlich intensiver als bei den Hauptfraktionen A, B oder C.

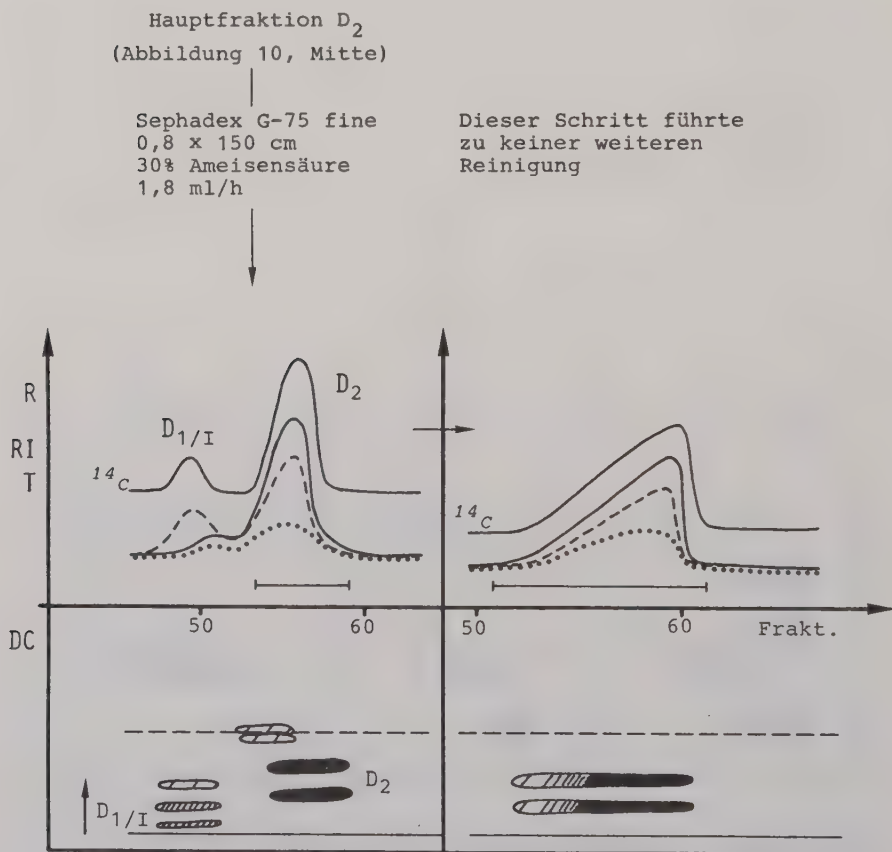


Abbildung 16 Rechromatogramme der Hauptfraktion D_2 aus der Bromcyanspaltung der Cm- α GPDH

Li. Sephadex G-50 sf.
0,8 x 150 cm
0,1 M Ammoniumhydrogen-
carbonat pH 8,6
1,8 ml/h

Re. Biogel P-6 (-400 mesh)
0,8 x 150 cm
10% Essigsäure
1,8 ml/h

Gelchromatographien auf verschiedenen Matrices mit unterschiedlichen Elutionsmitteln führten zum reinen Bromcyanpeptid. Zwei Isolierungswege, die nach der Spaltung von Aet- bzw. Cm- α GPDH beschrieben wurden, werden beschrieben (Abbildungen 15 u. 16).

D₂ enthielt nach Aminosäurenanalyse 2 Tyr (Tabelle 9). Da sich in der α GPDH-Untereinheit insgesamt 4 Tyr befinden sollten, war zu schließen, daß mindestens eine der ebenfalls Tyr enthaltenen Hauptfraktionen (A, B oder C) ein durch Bromcyan unvollständig gespaltenes Peptid besitzen müsse. Wie auf S. 55 näher erläutert, kam dafür am ehesten A in Frage.

	Aet-D ₂		Cm-D ₂			
	24 h		24 h	60 h	120 h	
Cys (Cm)			0,85	1,01	0,79	2
Asx	1,09	1	1,13	1,09	1,08	1
Thr	0,12		0,13	++	0,10	
Ser	0,17		0,17	++	0,13	
Hse	+++	1	0,77	0,76	0,59	1
Glx	4,88	5	4,60	4,49	4,25	5
Pro	1,76	2	1,74	1,85	1,91	2
Gly	2,00	2	1,97	1,86	1,69	2
Ala	1,03	1	1,04	1,02	0,97	1
Cys-2			0,50	0,41	0,72	
Val	2,62	3	2,33	2,51	2,52	3
Ile	0,91	1	0,87	0,99	0,98	1
Leu	1,07	1	1,17	1,18	1,15	1
Tyr	1,86	2	1,64	1,70	1,69	2
Phe	1,00	1	0,99	0,99	0,99	1
Lys	1,00	1	1,00	1,00	0,81	1
Cys (Aet)	1,51	2				
His	1,88	2	1,64	1,41	1,40	2
Hse>	++		++	++	++	
Arg	0,91	1	0,78	0,75	0,72	1
Gesamt		26				26
N-Term.		Ala				Ala

Tabelle 9 Aminosäurenanalysen von Aet- und Cm-D₂

5.5.2. Sequenzierung von D₂

Die Aminosäuresequenz von D₂ wurde durch automatischen Edman-Abbau des über Hse> an APG gekoppelten Bromcyanpeptids ermittelt und durch vier weitere, zu methodischen Studien durchgeführte Sequenzierungsläufe bestätigt (S. 72ff.):

D₂ Ala-Val-Tyr-Lys-Val-Cys-Tyr-Glu-Gly-
 -Gln-Pro-Val-Gly-Glu-Phe-Ile-Arg-Cys-
 -Leu-Gln-Asn-His-Pro-Glu-His-Met

Zur Überprüfung des Säureamid-Gehalts wurden ca. 6 nMol Aet-D₂ durch ein Gemisch aus Pronase P [326-328] und Aminopeptidase M [329,330] vollständig verdaut [231] und weitere 6 nMol zur Bestimmung von Glx und Asx in 5,7 N HCl totathydrolysiert. Die Aminosäureanalysen bestätigten die durch Sequenzierung erhaltene Anzahl von Säuren und Säureamiden (Tabelle 10):

D₂ enthält 1 Asn, 0 Asp, 2 Gln und 3 Glu pro Molekül.

D₂ ließ sich von allen Bromcyanpeptiden mit der höchsten Ausbeute isolieren. Überschüssige Substanz wurde verwendet, um an ihr unter gezielter Ausnützung der Festphasenmethodik modellhaft eine Strategie zu erproben, die geeignet erschien, auf schnelle und einfache Weise die Sequenzermittlung auch solcher Peptide zum Abschluß zu bringen, deren Totalsequenzierung mittels eines einzigen Laufes wiederholt scheiterte.

Aet-D ₂			Leerwert				
24 h		+NaN ₃		+NaN ₃			
sr.H.		enzym.	enzym.	enzym.	enzym.		
		a	a'	b	b'	a-b	a'-b'
Asx	0,96	0,46	0,41	0,37	0,32	0,09	0,09
Thr		0,56	0,41	0,62	0,56	0,00	0,00
Ser*		2,11	2,02	0,90	0,83	1,21	1,19
Hse	++	++	++			++	++
Glx	5,25	3,04	2,98	0,26	0,23	2,78	2,75
Pro**	n.b.						
Gly	1,88	2,59	2,48	0,82	0,75	1,77	1,73
Ala	1,00	1,71	1,60	0,69	0,59	1,02	1,01
Val	2,56	3,25	3,24	0,49	n.v.	2,76	n.v.
Met		0,16	0,15	0,10	+++	++	++
Ile	0,90	1,45	1,40	0,27	0,24	1,18	1,16
Leu	1,00	1,65	1,57	0,45	0,41	1,20	1,16
Tyr	1,62	2,34	2,30	0,37	0,34	1,97	1,96
Phe	0,90	1,33	1,35	0,18	0,17	1,15	1,18
Lys	1,00	1,12	1,07	0,23	0,21	0,89	0,86
Cys (Aet)	2,00	1,85	1,75			1,85	1,75
His	2,09	0,79#	0,78#	0,11	0,11	0,68#	0,67#
Hser>	++						
Arg	0,93	1,13	1,15	0,25	0,21	0,88	0,94
Asx	1					0	0
Glx	5					3	3

+NaN₃ mit Natriumazid als Bakteriostatikum
 sr.H. saure Hydrolyse
 n.b. nicht nachweisbar
 n.v. nicht verwertbar (techn. Defekt d. Integrators)
 a-b Differenz aus Probe und Leerwert (Puffer und Enzyme)

Tabelle 10 Aminosäurenanalysen eines chemischen (5,7 N HCl) und enzymatischen (Pronase P + Aminopeptidase M) Totalhydrolysats von Aet-D₂ zur Bestimmung der Säuren und Säureamide

- * Die Ser-Werte geben die Summe aus den Werten für Ser + Asn + Gln wieder. Bekanntlich werden die Säureamide mit ähnlicher Retentionszeit wie Ser vom Kationenaustauscher eluiert.
- ** Pro war, ob mit oder ohne NaN₃, überhaupt nicht nachweisbar. Für dieses Phänomen bot sich bisher keine Erklärung.
- # Die mit diesem Symbol bezeichneten His-Werte sind aus nicht bekannten Gründen zu niedrig. Dekomposition durch Bakterien [233] scheidet als mögliche Ursache aus, da sich die Werte auch nach Zusatz von NaN₃ zum Verdauungsmedium nicht anheben ließen.

5.5.3. Enzymatische Spaltung trägerfixierter Peptide

Die Sequenzierung von längeren Peptiden über weit mehr als 40 Positionen in einem Abbau ist möglich, vor allem seit Einführung automatisierter Verfahren [323,332], wenn auch ein heutzutage noch verhältnismäßig seltenes Ereignis im proteinchemischen Labor. In der Mehrzahl der Fälle erreicht man nach 30 bis 40 Schritten den Punkt, an dem die Komplexität der Spaltprodukte jede weitere Identifizierung ausschließt - eine in der Chemie des schrittweisen Peptidabbaus begründete prinzipielle Limitierung [333].

Für den Festphasensequenzierer - und nur ihm steht dieser elegante Weg als einer der spezifischen und potentiellen Vorteile seiner Methodik offen - besteht der einfachste Versuch zur Lösung des Problems darin, bei Erreichen der Mehrdeutigkeit den Abbau zu unterbrechen, das trägerfixierte Restpeptid einer chemischen oder enzymatischen Spaltung zu unterwerfen, und an den neuen, weitgehend einheitlichen N-Termini den Abbau fortzusetzen. Auf diese Weise könnte - ohne jeden chromatographischen Aufwand - in günstigen Fällen die Zahl der aufgeklärten Positionen erheblich erweitert werden.

Die Auswahl des fragmentierenden Agens richtet sich dabei grundsätzlich nach Art und Anzahl der im interessierenden Bereich einer Peptidkette anzutreffenden Aminosäurenreste. Es bietet sich Trypsin an, die bei der Ermittlung von Primärstrukturen wohl am häufigsten eingesetzte Protease: die günstige Zahl und Verteilung der von ihr attackierten Lys- und Arg-Bindungen in vielen Proteinen, ihre relativ hohe Spezifität, die breite Palette an Möglichkeiten zur Verringerung Spaltungssensibler Bindungen durch (ir)reversible chemische Blockierung der Lys- oder Arg-Seitenketten bzw. deren Vermehrung durch Einführung des Lys-analogen Cys(Aet) zählen zu den Hauptgründen ihrer Beliebtheit.

Versuche mit Trypsin und Chymotrypsin nach der oben geschilderten Prozedur erwiesen sich jedoch als Fehlschläge. Die Spaltungsausbeuten waren enttäuschend niedrig. Als eine mögliche Ursache wurde ein ungünstiger Einfluß der die Glasober-

fläche bedeckenden Benzolreste der Phenylthiocarbamyl (Ptc)-Gruppen auf die enzymatische Aktivität diskutiert. Weniger wahrscheinlich dagegen waren von der Art der Derivatisierung ihrer Aminofunktionen unabhängige, nicht näher definierbare störende Wirkungen der Festphase selbst.

Läßt man einmal das nicht vorhersehbare Verhalten von Enzymen an seiner (derivatisierten) Oberfläche außer Betracht, so empfiehlt sich poröses Glas im Hinblick auf die verfolgte Strategie geradezu als Matrix der Wahl zur Verankerung von Peptiden:

einer der herausragenden und entscheidenden Vorteile der Festphasenmethodik beruht auf der schnellen und einfachen Isolierung von trägergebundenen bzw. vom Träger freigesetzten Substanzen durch Filtration; in Verbindung mit der seit Einführung von porösem Glas als unlöslichem Träger zur Festphasen-Sequenzierung von Peptiden vielfach bewährten physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie hohe chemische Stabilität, kein lösungsmittelabhängiges Quellen und Schrumpfen mit den daraus resultierenden Druckschwankungen im Durchfluß und hohe Stabilität von chemisch modifiziertem Glas bei langzeitiger Lagerung, läßt es ein, verglichen mit Festphasen auf Polystyrol-Basis, einfacheres und erfolgreicherer Arbeiten erwarten.

Um die eingangs erwähnten, vermutlich durch spezifische Eigenschaften des Ptc-Glases verursachten Schwierigkeiten zu umgehen, wurde die Strategie zur Sequenzierung schwieriger Peptide, wie folgt, modifiziert; das Vorgehen wurde in 3 Schritte aufgegliedert:

Im 1. Schritt ist zu versuchen, das trägergebundene Peptid so weit wie möglich nach Edman abzubauen.

Im 2. Schritt wird ein weiteres Aliquot des trägergebundenen Peptids enzymatisch verdaut, und das nach Filtration am Träger verbliebene Restpeptid sequenziert.

Im 3. Schritt werden die vom Träger freigesetzten und im Filtrat gesammelten Fragmente, soweit erforderlich, isoliert und direkt oder nach erneuter Fixation an die Festphase nach Edman abgebaut.

Die folgenden Experimente hatten zum Ziel, die Tauglichkeit der vorgeschlagenen Strategie an D_2 als Modellpeptid zu prüfen. Daneben interessierte der Einfluß unterschiedlich derivatisierter bzw. geladener Glasderivate auf die enzymatische Aktivität. Zu diesen Zwecken wurde glasgebundenes D_2 entweder mit keinem Aminogruppen-blockierenden Reagens umgesetzt, oder mit einem anderen als Phenylisothiocyanat (PITC).

In Experiment I wurde ein Aliquot $^{14}\text{Cm-D}_2$ durch Homoserinlacton-Kopplung an APG gebunden und mit L-1-Chlor-3-p-tosylamido-4-phenyl-2-butanon (TPCK)-behandeltem Trypsin verdaut (Abbildung 17). Der Träger wurde auf der Fritte gewaschen und das Enzym durch Ansäuern des Filtrats denaturiert. Das am Glas verbliebene Peptid wurde sequenziert (Abbildung 18, Li.), die filtrierten Fragmente gelchromatographisch aufgetrennt, charakterisiert und quantifiziert (Tabelle 11, I; Abbildung 19, I).

In Experiment II wurde ein Aliquot $^{14}\text{Cm-D}_2$ in Lösung mit TPCK-Trypsin unter den gleichen Bedingungen wie in Experiment I gespalten (Abbildung 17), die Fragmente am Molekularsieb getrennt, charakterisiert und quantifiziert (Tabelle 11, II; Abbildung 19, II).

In Experiment III wurde ein Aliquot $^{14}\text{Cm-D}_2$ durch Homoserinlacton-Kopplung an APG gebunden und die Aminogruppen von Peptid und Träger mit Citraconsäureanhydrid (CTA) maskiert [334]. Das mit TPCK-Trypsin inkubierte, modifizierte Glas wurde auf der Fritte gewaschen, die Peptide des Waschwassers gelfiltriert, charakterisiert und quantifiziert (Abbildungen 19, III u. 20, III).

In Experiment IV wurde wie in Experiment III verfahren, mit dem Unterschied, daß trägergebundenes Aet- D_2 mit Di-tert.-butyldi-carbonat (dBdC) [335] umgesetzt wurde (Abbildungen 19, IV u. 20, IV).

In Experiment V wurden die Carboxylgruppen von $^{14}\text{Cm-D}_2$ mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) aktiviert [336] und durch Aminolyse von APG an die Festphase gebunden. Nach tryptischer Spaltung des trägergebundenen Peptids und Waschen des Glases auf der Fritte wurden 11 Edman-Abbauzyklen durchgeführt (Abbildung 21).

Die Ergebnisse der Experimente I-IV belegen, daß die enzymatische Verdauung eines Glas-immobilisierten Peptids möglich ist.

Das Gaschromatogramm von Schritt 1 aus dem Abbau des an der Matrix verbliebenen, C-terminalen Fragments T3 (Experiment I) vermittelt einen Eindruck von der Homogenität der Probe (Abbildung 18, Re.). Neben dem starken Signal für Cys(Cm)₁₈-Pth traten, infolge der inkompletten enzymatischen Hydrolyse, in deutlich geringerer Ausbeute die Pth-Derivate von Ala₁ (T1-T2-T3 = D₂), Val₅ (T2-T3), Leu₁₉ (-Cys(Cm)₁₈-) und Pro₁₁ (-Gln₁₀-) bzw. Pro₂₃ (-His₂₂-) als Signale untergeordneter Peptide auf. Der kombinierte Einsatz von GC- und MS-Analyse von Pth-Aminosäuren, sowie die Einführung von Isotopenmarkern, erlauben die lückenlose Dokumentation einer Sequenz; sie liefern darüberhinaus zusätzliche Information über die Natur von nur in Spuren vorliegenden Komponenten. Die Existenz der Hintergrund-Peptide Cm-D₂ und T2-T3 konnten mittels ihrer Nebensequenzen über mehrere Zyklen verfolgt werden: Cm-D₂ z.B. ließ sich an Hand des Radioaktivitätsprofils (Anstieg in Schritt 6) und der MS-Daten bis zur Position 9 nachweisen.

Ein Vergleich der Fragmentausbeuten in den Experimenten I und II, sowie jener an unterschiedlich derivatisiertem Aminoglas, offenbart bemerkenswerte Unterschiede (Tabelle 11; Abbildung 19): wegen ihrer Reproduzierbarkeit unter wechselnden Spaltungsbedingungen müssen sie distinkte Einflüsse des derivatisierten Glases auf das verankerte Peptid und/oder das Enzym reflektieren. Sie mechanistisch zu erklären, ist unter anderem wegen der geringen Zahl an Versuchen nicht möglich. Nichtsdestoweniger wurden bei vielen anderen Verdauungen an unmodi-

Abbildung 17 Chemie der Homoserinlacton-Kopplung von Cm-D₂ an APG und tryptische Spaltung gleicher Mengen von trägerfixiertem und gelöstem Peptid (Experimente I und II)

Zu beiden Seiten des schematisch dargestellten Filtratgefäßes sind die Ausbeuten für die in den Gefäßraum eingezeichneten Spaltpeptide in % der Ausgangsmenge angegeben.

- 1 Cm-D₂ (Homoserin-Form)
- 2 Cm-D₂ (Homoserinlacton-Form)
- 3 Cm-D₂ (C-terminal an APG fixiert)
- 4 C-terminales Peptid von Cm-D₂ nach Trypsin-Spaltung
Experiment I: trägegebunden
Experiment II: in Lösung
- 5 Filtrat (Waschwasser) nach tryptischer Spaltung von trägegebundenem Cm-D₂

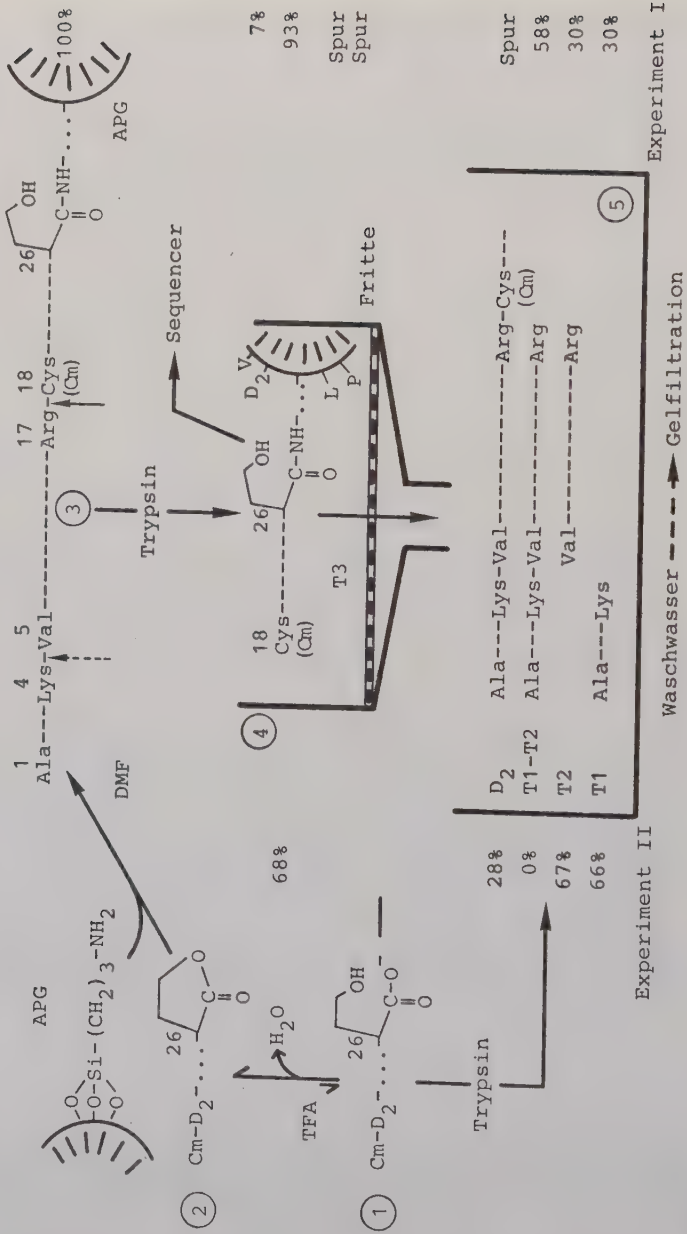


Abbildung 17 (S. 76)

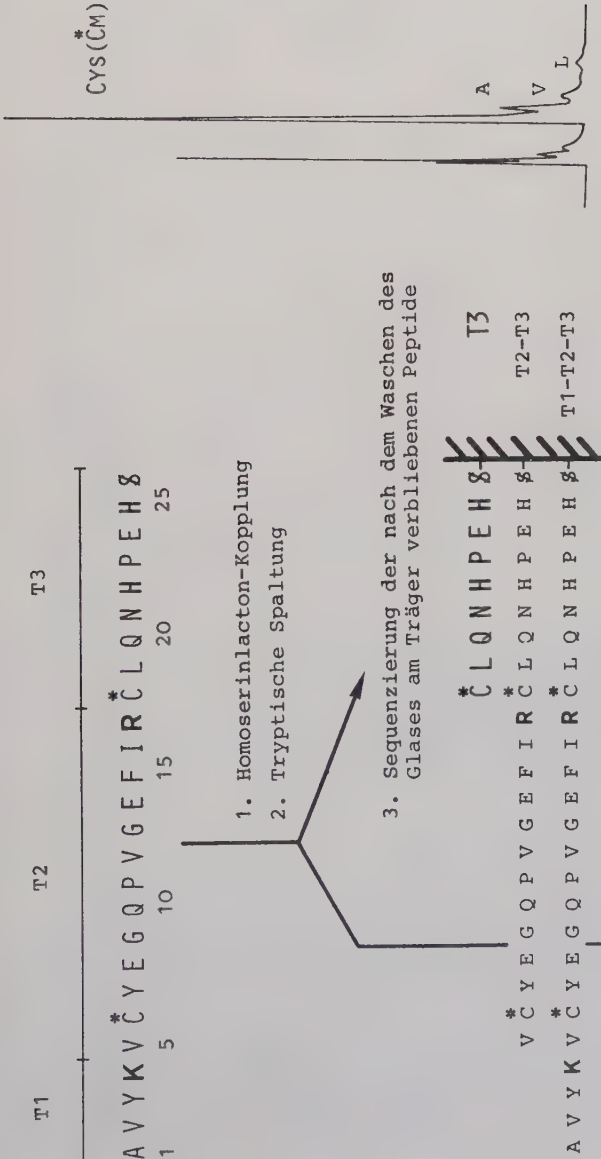


Abbildung 18, Li.

4. Peptide des Wäschwassers

T1-T2

T1, T2

(Gelfiltration)

Kopplung

Strukturaufklärung mittlerer und C-terminaler Bereiche von Peptiden.

Demonstration der Strategie "Koppeln-Spalten-Sequenzieren" am Beispiel des Homoserinpeptids Cm-D₂

§ Homoserin
* ¹⁴C
C

¹⁴C-Carboxymethyl-Cys

Abbildung 18, Re.

Gaschromatogramm von Schritt 1 aus dem Edman-Abbau der nach tryptischer Spaltung von glasgebundenem Cm-D₂ am Träger verbliebenen Peptide.

G R O S S Hauptfragment
K L E I N Nebenfragment

Experiment Peptid	I	II	T1	I	II	T2	I	II	T3	I	II	T1-T2	I	II	D ₂
Cys (O ₃ H)							+++								
Cys (Cm)						1	0,51		1	0,67					2
Asx	+	0,13		0,29	0,14		1,25		1	1,01		1			1
Thr	+			0,18	+		0,22								
Ser	+	0,15		0,33	0,20		0,36								
Hse							+++		1	+++					1
Glx	+			3,40	3,12	3	2,78		2	2,17		3			5
Pro		0,12		1,04	1,01	1	1,39		1	1,04		1			2
Gly	0,23	0,16		2,20	1,93	2	0,63			0,24		2			2
Ala	0,97	1,00	1	0,31	0,13		0,27					1			1
Cys-2				+	+					+					
Val	1,00	0,87	1	1,98	1,57	2	0,36			+		3			3
Ile				0,87	0,62	1	0,18			+		1			1
Leu				0,18			1,33		1	1,00					1
Tyr	0,87	0,74	1	0,58	1,00	1	n.b.					2			2
Phe				1,00	0,96	1	n.b.					1			1
Lys	1,10	0,98	1	0,33	0,19		0,25			+		1			1
His							1,80		2	1,79					2
Hse>					0,15										
Arg				1,00	0,95	1	0,13					1			1
Gesamt			4			13			9			17			26
N-Term.	Ala			Val			Cys (Cm)		Ala					Ala	
Ausbeute (nMol)	48	106		48	107		149	109	93	0		11	45		

Tabelle 11 Aminosäureanalysen (24h) der Fragmente aus der tryptischen Verdauung von
 - trägegebundenem Cm-D₂ Experiment I
 - gelöstem Cm-D₂ Experiment II

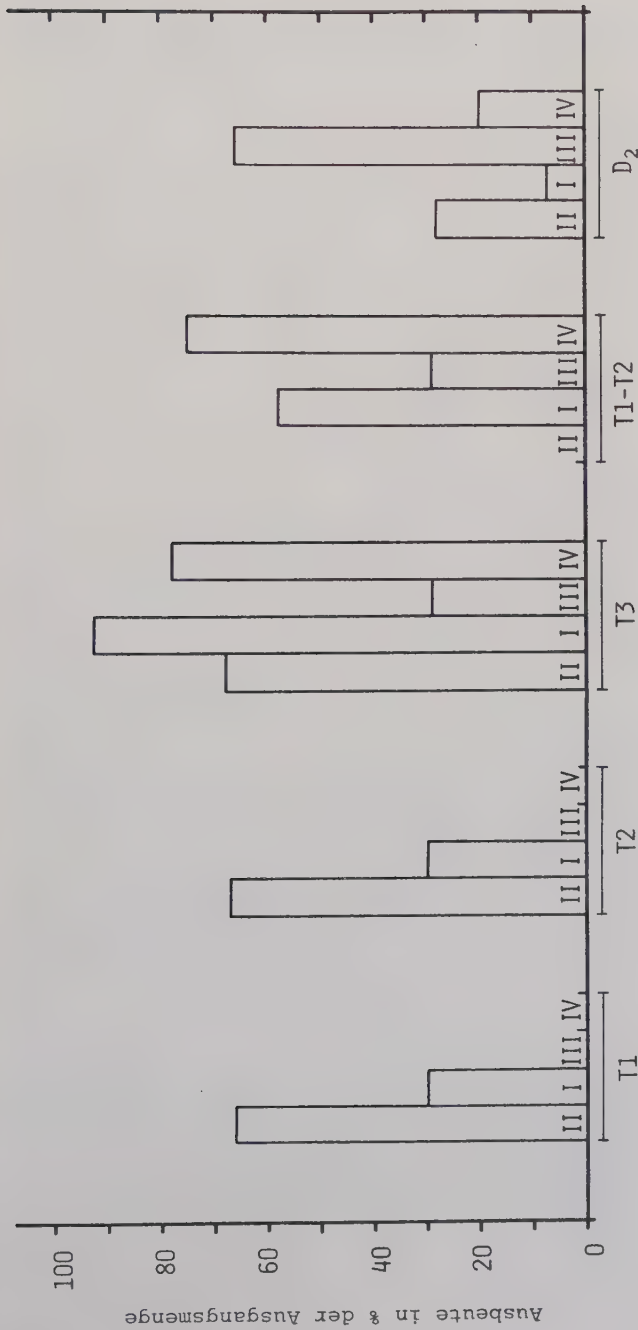


Abbildung 19 Schematische Darstellung der prozentualen Ausbeuten an Fragmenten aus den Experimenten

II Tryptische Spaltung von gelöstem

I " " " über Hse an APG fixiertem, nicht Aminogruppen-blockiertem

III " " " " citraconyliertem

IV " " " " tbutoxycarbonyliertem

Cm-D₂ (160 nMol)

Cm-D₂ (160 nMol)

Cm-D₂ (124 nMol)

Aet-D₂ (285 nMol)

fiziertem Glas selektive Spaltungen mit guten Ausbeuten beobachtet. Offenbar schaffen die Aminopropyl-Liganden ein Milieu, welches mit dem in konventionellen Spaltungsmedien vergleichbar ist; man kann sie in der Tat als immobilisierte Pufferkationen betrachten.

Eine Blockierung der Lysine und Lysin-analogen Aminosäurenderivate beschränkt den tryptischen Angriff auf die Arginyl-Bindungen und führt so zu einer verminderten Zahl von Fragmenten (Experimente III u. IV). Die Modifizierungsreaktion kann dabei wegen der schnellen Reinigung des Reaktionsprodukts durch Waschen auf der Fritte besonders vorteilhaft an trägergebundenen Peptiden durchgeführt werden. Sie ist vor allem dann zu empfehlen, wenn durch die nachfolgende tryptische Spaltung im Hinblick auf die Sequenzierung der Länge und Zusammensetzung nach günstigere Fragmente entstehen.

Auffallend hoch war die Menge des in Experiment III nach Beendigung der Spaltung völlig intakt gebliebenen Ausgangspeptids (66%). Inwieweit ungünstige Interaktionen zwischen dem mit negativen Ladungen besetzten Träger und dem Peptid bzw. zwischen Träger und Enzym dabei eine Rolle spielten, läßt sich erst nach systematischen Spaltungsversuchen unter Verwendung unterschiedlich zusammengesetzter Peptide beurteilen. Letztlich entscheidend ist in jedem Fall die Frage, ob das aus der Spaltung resultierende Restpeptid zu einer erfolgreichen Sequenzierung ausreicht. Erneut wird deutlich, wie sehr die Tauglichkeit einer Sequenzierungsstrategie über Spezifität und Ausbeuten chemischer und enzymatischer Reaktionen hinaus von der Nachweisempfindlichkeit des Detektionssystems für die Aminosäuren-Pth's, und noch mehr von deren exakter Quantifizierbarkeit, abhängt:

die Sequenzierung des 9 Aminosäuren umfassenden, C-terminalen Peptids von D₂ sollte nach bisheriger Erfahrung durch den kombinierten Einsatz von Massenspektrometrie, Gaschromatographie und Aminosäureanalytik (Rückhydrolysen) trotz Überlagerung durch die Signale des in doppelter Menge vorliegenden, ungespaltenen Ausgangspeptids kaum Probleme stellen. Selbst bei einer repetitiven Ausbeute von z.B. 90% für beide Komponenten

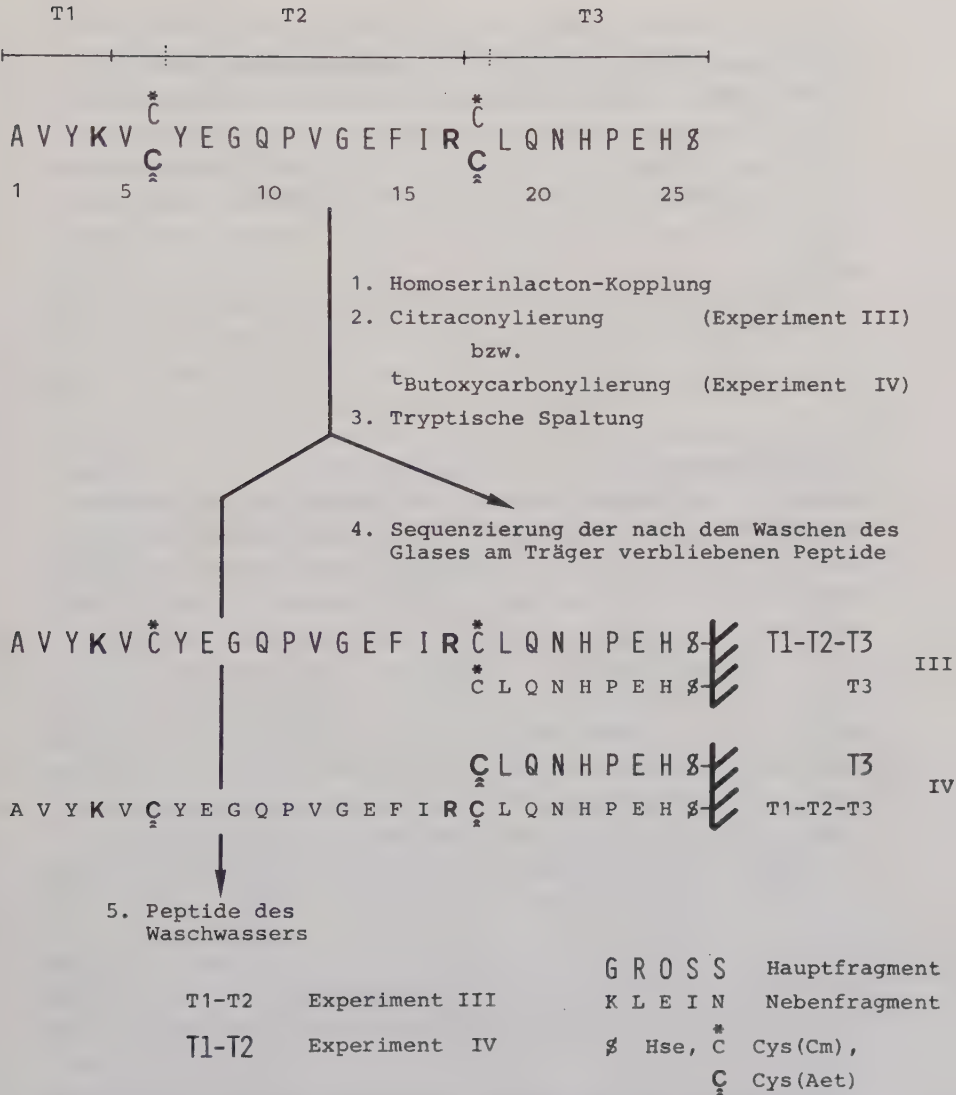


Abbildung 20

Strukturaufklärung mittlerer und C-terminaler Bereiche von Peptiden.

Demonstration der Strategie "Koppeln-Modifizieren-Spalten-Sequenzieren" am Beispiel des Homoserin-peptids Cm-D₂ (Experiment III) bzw. Aet-D₂ (Experiment IV).

fallen nach dem 9. Abbauzyklus noch ca. 12 nMol Hse-Pth (T3) und 28 nMol Gly-Pth (D₂) an - für deren Nachweis ausreichende Substanzmengen. Man muß allerdings im Auge behalten, daß die repetitive Ausbeute eine lediglich statistische Größe darstellt und daher im Einzelfall, d.h. für den einzelnen Abbau-schritt zu einer falschen Interpretation führen kann.

Schritt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T3	* C ₂₉	L ₂₆	Q ₂₃	N ₂₁	H ₁₉	P ₁₇	E ₁₅	H ₁₄	S ₁₂	- nMol
D ₂	A ₆₆	V ₅₉	Y ₅₃	K ₄₈	V ₄₃	C ₃₉	Y ₃₅	E ₃₂	G ₂₈	Q nMol

Die erfolgreiche Identifizierung einer und nur dieser Aminosäure als Inhaberin einer bestimmten Position innerhalb der aufzuklärenden Aminosäuresequenz wird weniger durch ihre absolute Menge limitiert als vielmehr durch die nicht seltene Komplexität des aus dem Abbau resultierenden Aminosäuren-Pth-Gemisches. Sie nimmt im Verlauf einer Sequenzbestimmung zu und wird in der Hauptsache durch Acidolyse und Overlap verursacht. Die eindeutige Interpretation eines komplexen Signalprofils gelingt jedoch nur so lange, solange das Signal/Rausch-Verhältnis bei gegebener Detektion zweifelsfrei zu deuten ist. Über eine längere Sequenz hinweg kann diese analytische Leistung nur mit Hilfe eines feinauflösenden Quantifizierungsverfahrens erbracht werden. Die Aufarbeitung der Daten könnte rationell mit Kleinrechnern erfolgen.

Sehr interessant ist die Tatsache, daß im Gegensatz zu der am Ptc-Glas beobachteten ungenügenden Spaltungseffizienz die Fragmentausbeuten am ^tBoc-Glas hoch waren (Experiment IV). Da beide Derivate von vergleichbarer Hydrophobizität sein dürften, sind diese Unterschiede wahrscheinlich auf derzeit nicht näher definierbare molekulare Qualitäten zurückzuführen, die mit ihrem Aryl- bzw. Alkylcharakter in Zusammenhang stehen.

Enzymatische Spaltungen an der Festphase können im Prinzip auch in Fällen durchgeführt werden, in denen das Peptid über andere Reste als Homoserin am Glas verankert wurde: HOBT-aktiviertes Cm-D₂ wurde über Carboxylfunktionen an APG gekoppelt und mit Trypsin inkubiert. Die Waschwassersubstanzen wurden gelchromatographisch untersucht, die am Träger verbliebenen Peptide über 11 Schritte nach Edman abgebaut (Experiment V).

Bei der Dünnschichtchromatographie der Fraktionen tauchten Fluorescamin-positive Flecken erst nach Einsatz von ca. 10% der Probenvolumina auf. Auf eine Identifizierung der Substanzen wurde wegen der geringen Mengen verzichtet.

Eine Charakterisierung der Trägerpeptide mittels Aminosäurenanalyse war ebenfalls nicht möglich, da nach dem Waschen des Glases praktisch alle Spaltpeptide an der Matrix blieben; die Aminosäurenanalyse eines Trägerhydrolysats war mit der des Ausgangspeptids nahezu identisch.

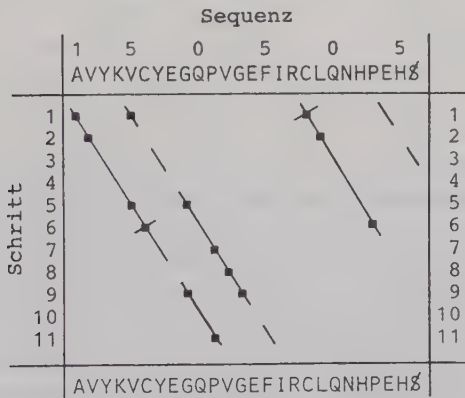


Abbildung 21 Identifizierungsschema des Edman-Abbaus der Trägerpeptide aus der tryptischen Spaltung von C-terminal gekoppeltem Cm-D₂ (Experiment V)

Identifizierung der Aminosäuren-Pth's mittels

- ↘ Massenspektrometrie
- Gaschromatographie
- ↗ Radioaktivitätsmessung

Bei Kenntnis der D_2 -Sequenz war es jedoch nicht schwierig, an Hand der GC- und MS-Profile und der Radioaktivitätskurven der aus dem Abbau gewonnenen Aminosäuren-Pth's die Paralleelsequenzen von 4 Peptiden zu verfolgen: D_2 (N-Terminus Ala₁), T2 (N-Terminus Val₅) und T3 (N-Terminus Cys(Cm)₁₈); die Existenz eines vierten Peptids (N-Terminus Glu₂₄) ließ auf eine Spaltstelle bei Pro₂₃ schließen, welche unerwartet war (Abbildung 21).

Die Bindung Arg₁₇-Cys(Cm)₁₈ wurde im Gegensatz zu Experiment I, bei dem D_2 ausschließlich über sein C-terminales Hse an der Matrix verankert war, in weitaus geringerem Maße gespalten. Es ist anzunehmen, daß durch die teilweise Mehrfachverankerung der Peptidkette über die zahlreichen Seitenketten-Carboxylgruppen (insgesamt 6 von 26 Aminosäuren) deren Beweglichkeit eingeschränkt wird, was sich auf die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes hindernd auswirkt. Durch die Anheftung des Peptids über Seitenkettenfunktionen wird der Abstand Peptid-Matrixoberfläche verringert und der Angriff des Enzyms auf die prinzipiell sensitive Bindung wahrscheinlich auf Grund ihrer unmittelbaren Nachbarschaft zu einem Fixationspunkt, d.h. aus sterischen Gründen, erschwert. Aus der Tatsache allerdings, daß die genannte Bindung auch bei Abwesenheit der Festphase - bei Spaltung von gelöstem Cm- D_2 - nur partiell geöffnet wurde (Experiment II) ist zu schließen, daß sterische Faktoren allein keine ausreichende Erklärung für diese Spaltungsresistenz bieten.

Das Auftreten von markiertem Cys(Cm)₁₈-Pth und von Glu₂₄-Pth deutete darauf hin, daß die Immobilisierung der Seitenkettenfunktionen unvollständig war - ein bei C-terminalen Kopplungsmethoden und der Diisothiocyanat (DITC)-Kopplung [337] häufig beobachteter Befund.

Wo die Information über die Verteilung von Seitenkettenfunktionen spärlich und die Lacton-Kopplungsmethode nicht anwendbar ist, bleibt der Erfolg einer Festphasen-Sequenzbestimmung dem Zufall überlassen. Multiple Fixationsorte verhindern häufig die enzymatische Freisetzung einer einzigen, homogenen N-terminalen Aminosäure. Unter diesem Aspekt war D_2 als Modellpeptid ungeeignet.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich die enzymatische Spaltung glasgebundener* Peptide mit oder ohne vorhergehende chemische Modifizierung funktioneller Gruppen als eine taugliche, alternative Route zur Strukturaufklärung C-terminaler Bereiche längerer Peptide anbietet. Ihre Hauptvorteile sind die Einfachheit und Schnelligkeit, mit denen in vielen Fällen C-terminale Fragmente von geeigneter Länge, z.B. durch tryptische Spaltung nach Aminogruppen-Blockierung, hergestellt werden können. Die Anwendbarkeit der Methode wird durch die Art der Kopplung entscheidend eingeschränkt. Ein-Punkt-Verankerungen am Carboxylende ermöglichen im Prinzip die Sequenzbestimmung bis hin zum letzten Aminosäurenrest. Das Vorliegen einer einzigen N-terminalen Aminosäure erleichtert dabei die Identifizierung der Spaltprodukte beim Edman-Abbau.

Einer Ausdehnung des Enzymspektrums und der Liste von Modifizierungsreaktionen steht nichts im Wege. Zukünftige Erfahrungen mit enzymatischen Spaltungen an unterschiedlichen Glasderivaten könnten zur Definition der chemischen und physikalischen Faktoren führen, die auf die enzymatische Aktivität Einfluß nehmen. Ihre Kenntnis würde uns in die Lage versetzen, gezielt die jeweils geeignetste Kombination von Enzym und modifizierendem Agens zu wählen.

Die Möglichkeit der Waschung des Glases auf der Fritte ist einer der Festphasenmethodik-spezifischen Vorzüge, für die es in anderen Methoden hinsichtlich Effizienz, Schnelligkeit und Einfachheit der Prozedur nichts Vergleichbares gibt. Sie ist dann von außerordentlichem Nutzen, wenn ein Reagens in wässrigen Lösungen unlöslich ist und Zeit und Mühe erforderlich sind, es quantitativ wieder zu entfernen: man suspendiert das Glas einfach in einem geeigneten (nicht-wässrigen) Lösungsmittel, wie z.B. Dimethylformamid, gibt das Reagens zu und filtriert, wenn die Reaktion beendet und das Produkt gereinigt werden soll. Auf diese Weise werden z.B. mit dBdC^tBoc -Gruppen in Aminofunktionen eingeführt. Bekanntlich ist dieses Reagens mit Dioxan oder Tetrahydrofuran als Lösungsvermittler in wässrigen

* Über die Durchführbarkeit enzymatischer Spaltungen von Proteinen, die an andere Träger als Glas gekoppelt wurden, wurde bereits berichtet, z.B. [338].

Lösungen reaktiv und zerfällt beim Ansäuern quantitativ in ungiftige Gase (Isobuten und CO_2). Es ist aber äußerst mühevoll, nach Modifizierung des Peptids in Lösung überschüssiges dBdC im Vakuum quantitativ zu entfernen, wenn jenes anschließend proteolytisch verdaut werden soll.

5.6. Isolierung und Sequenzierung der Bromcyanpeptide $\text{D}_{1/\text{I}}$ und $\text{D}_{1/\text{II}}$

5.6.1. Isolierung von $\text{D}_{1/\text{I}}$ und $\text{D}_{1/\text{II}}$

Die Inhomogenität der Hauptfraktion D_1 aus der primären Auftrennung der Bromcyanpeptide wurde durch das Auftreten von 2 N-terminalen Aminosäuren - Gly und Leu - bei der Endgruppenbestimmung belegt. Die DC-Analyse dieses Bereichs war wegen der Vielzahl von Banden wenig aussagekräftig. Ihr Muster schloß jedoch die Existenz von mehr als 2 Peptiden nicht aus (Abbildung 10).

Der Versuch, die der Größe nach ähnlichen Fragmente durch Gel-filtration voneinander zu trennen, schien nach der ersten Rechromatographie wenig aussichtsreich (Abbildung 22, Oben). In der Elektrophorese bei pH 6,5 auf Acetylcellulose wanderten sie in geringem Abstand voneinander kathodenwärts; einer dritten Komponente mit der relativ größten positiven Nettoladung wurde wegen ihrer geringen Anfärbbarkeit keine weitere Beach-

tung geschenkt (Abbildung 23). Durch Adaption der elektrophoretischen Verhältnisse auf ein säulenchromatographisches System wurde eine präparative Isolierung der D_1 -Peptide versucht (Abbildung 22, Mitte). Die Trennung der beiden Komponenten gelang und ermöglichte die Untersuchung ihrer Zusammensetzung durch Aminosäurenanalyse: die Komponente mit dem N-Terminus Gly umfaßte 33, jene mit dem N-Terminus Leu 32 Aminosäuren (Tabelle 12). Erstere wurde mit $D_{1/I}$ bezeichnet, letztere mit $D_{1/II}$.

Trotzdem bot der Einsatz der Ionenaustauschchromatographie als präparative Trennmethode keine befriedigende Lösung: die Ausbeute an $D_{1/I}$ betrug nur 15%, die an $D_{1/II}$ 10% der Ausgangsmenge. Zwar ließ sich das am Austauscher adsorbierte Material durch Anlegen eines pH-Gradienten (4,8-12) weitgehend (85%) wiedergewinnen, eine Trennung war unter diesen Bedingungen jedoch nicht mehr zu erreichen.

Bei der Suche nach einem tauglicheren Trennverfahren für die D_1 -Komponenten stellte sich durch Zufall heraus, daß $Cm-D_{1/I}$ in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6 wesentlich besser löslich ist als $Cm-D_{1/II}$. Die Messung der Radioaktivität von Sediment und Überstand einer zentrifugierten Probe ergab in letzterem eine ca. 80% Anreicherung von $D_{1/I}$. Konzentrierung des Überstandes führte zur Ausfällung des Peptids. Es wurde deshalb bei den folgenden Chromatographieschritten in basischen Puffern (Abbildung 24) streng auf eine ausreichende Verdünnung der Substanz geachtet.

Die Aet-Derivate der D_1 -Peptide unterschieden sich hinsichtlich des geschilderten Lösungsverhaltens von ihren Cm -Analogen: keines der Bromcyanfragmente löste sich in ausreichendem Maße bei pH-Werten zwischen 8,0 und 9,5. Eine Konzentrationsabhängigkeit war in diesem Falle nicht gegeben. Die Reindarstellung der Aet-Derivate gelang durch wiederholte Gelchromatographie auf Sephadex G-25 in 1% Ameisensäure; an beiden Flanken der sich überlappenden Peaks konnten homogene Fraktionen von 30-40% der Auftragsmenge abgenommen werden.

Hauptfraktion D₁
(Abbildung 11, Oben)

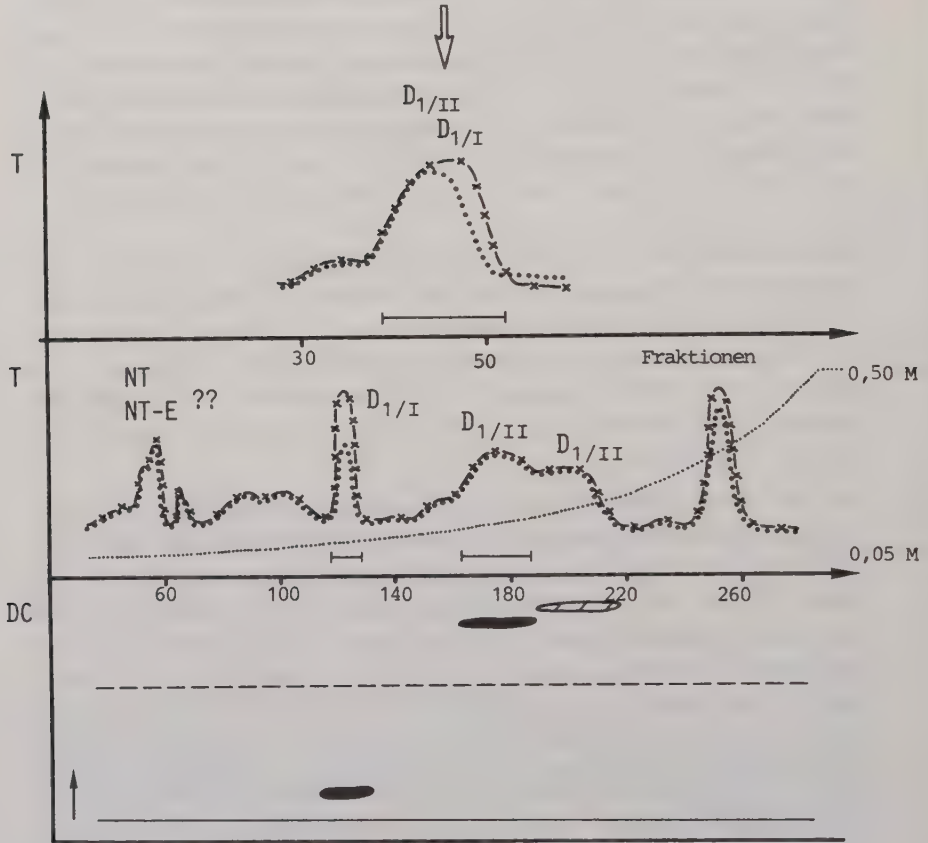


Abbildung 22 Rechromatogramme der Hauptfraktion D₁ aus der Bromcyanspaltung von Aet- α GDH

Oben Sephadex G-50 sf.
0,8 x 150 cm
0,1 M Ammoniumacetat pH 4,8
2,16 ml/h

Mitte Ionenaustauschchromatographie
Sephadex SP C-25
0,4 x 100 cm
zuerst Gleichgewichtschromatographie,
dann konkaver Gradient
0,05-0,50 M Ammoniumacetat pH 4,8
0,54 ml/h

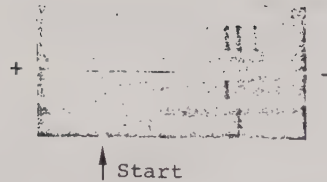


Abbildung 23

Acetylcellulose-Gelelektropherogramm von
Aet-D_{1/I} und Aet-D_{1/II}

Oben als Gemisch (Abbildung 22, Oben)

Unten nach der Trennung (Abbildung 22, Mitte)

	Aet-D _{1/I}		Aet-D _{1/II}			(NT, NT-E ₁) ?	
	24h		24h	120h		24h	
Asx	2,81	3	1,92	1,71	2	2,53	3
Thr	1,79	2	0,89	0,52	1	0,93	1
Ser	0,83	1	0,95	0,80	1	2,03	2
Hse	++	1	++	+	1	+	1
Glx	6,30	7	4,78	4,37	5	3,67	2
Pro			1,98	0,99	2	0,67	1
Gly	2,66	3	3,02	3,03	3	4,83	6
Ala	3,77	4	1,00	1,00	1	4,53	6
Val	1,02	1	0,90	0,97	1	2,17	3
Ile	1,81	2	0,65	0,99	1	1,67	3
Leu	2,79	3	5,13	5,94	6	1,77	1
Tyr						+	
Phe	1,06	1	1,94	1,90	2	0,90	1
Trp					1*		1
Lys	3,11	3	2,01	1,98	2	4,77	3
Cys (Aet)	1,89	2	+	+		0,67	1
His			1,85	1,50	2	+	
Hse>	+		+	+		+	
Arg			0,93	0,91	1	0,60	1
Gesamt		33			32		32
N-Term.	Gly		Leu			Spuren von Ala	
						Gly	

Tabelle 12

Aminosäurenanalysen von Aet-D_{1/I} und Aet-D_{1/II}
und der zunächst nicht identifizierten Fraktion
(NT, NT-E₁)

Mit der im Lauf der Zeit vervollständigten Kenntnis sämtlicher Bromcyanpeptide der αGPDH dürfte es sich bei der Substanz (NT, NT-E₁) sehr wahrscheinlich um das damals noch nicht identifizierte N-terminale, acetylierte Bromcyanpeptid oder einem Gemisch aus diesem und dem Acidolyseprodukt NT gehandelt haben.

* die Zahl der Trp konnte erst nach Sequenzierung des Peptids endgültig festgelegt werden. Der Trp-Rest ist extrem säureempfindlich.

Hauptfraktion D_1
(Abbildung 10, Mitte)

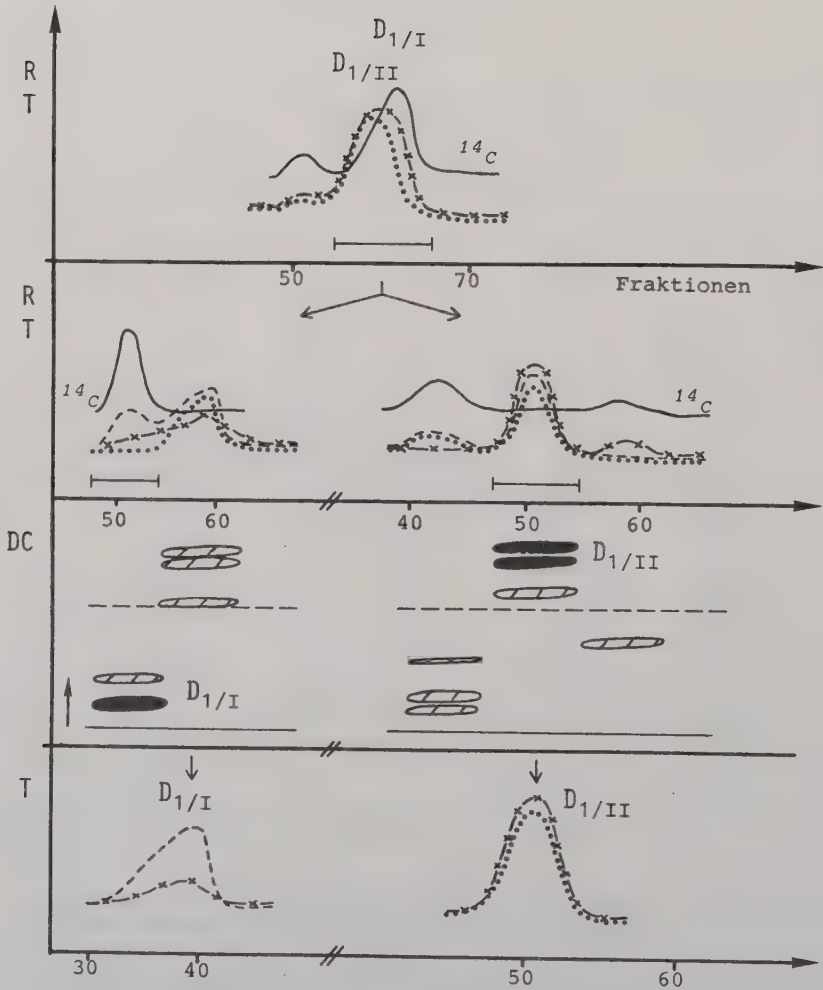


Abbildung 24 Rechromatogramme der Hauptfraktion D_1 aus der Bromcyanspaltung von ^{14}Cm - α GPDH

Oben	Sephadex G-75 fine 0,8 x 150 cm 30% Ameisensäure 1,8 ml/h	
Mitte Li.	Sephadex G-50 sf. 0,8 x 150 cm 0,1 M Ammoniumhydrogen- carbonat pH 8,6 1,8 ml/h	Re. Biogel P-6 (-400 mesh) 0,6 x 150 cm 10% Essigsäure 1,2 ml/h
Unten Li.	Biogel P-6 (-400 mesh) 0,6 x 150 cm 10% Essigsäure 1,2 ml/h	Biogel P-6 (-400 mesh) 0,6 x 150 cm 10% Essigsäure 1,2 ml/h

5.6.2. Sequenzierung von $D_{1/I}$

Das Bromcyanpeptid wurde mit der Lacton-Kopplungsmethode an den Mischträger APG/ β -N-Aminoethyl-(3-aminopropyl)-Glas (β -APG) [339] bzw. APG allein gebunden und nach Edman automatisch abgebaut.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde ein weiteres Aliquot über die Aminogruppen des Peptids durch Reaktion mit dem Diisothiocyanat (DITC)-Derivat von APG (DITC-Glas) [324,325] an die Festphase gebunden und ebenfalls automatisch abgebaut:

$D_{1/I}$	Gly-Ala-Asn-Ile-Ala-Ser-Glu-Val-Ala- -Asp-Glu-Lys-Phe-Cys-Glu-Thr-Thr-Ile- -Gly-Cys-Lys-Asp-Gln-Ala-Gln-Gly-Gln- -Leu-Leu-Lys-Gln-Leu-Met
-----------	--

Das bei der DITC-Kopplung in Schritt 1 aufgetretene Gly-Pth ist Ausdruck einer unvollständigen Fixierung der α -NH₂-Gruppe. Dieser Befund erinnert an die bei der C-terminalen Kopplung gemachte Feststellung einer unvollständigen Reaktion der

Seitenketten-Carboxylgruppen mit dem Träger. In der Spaltungsphase von Schritt 30 wurde das C-terminale Tripeptid Gln-Leu-Hse freigesetzt (Tabelle 13). Bei der Quantifizierung von Schritt 31 errechnet sich ein Overlap von 50%. In Schritt 32 waren von Hse, Glx und Leu nur noch Spuren zu finden.

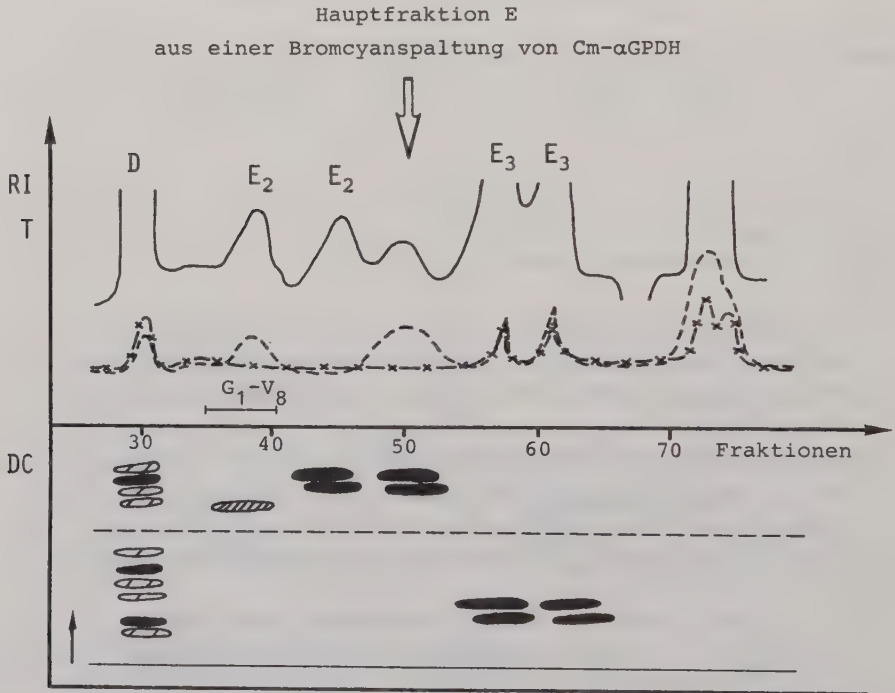


Abbildung 25 Rechromatogramm der Hauptfraktion E aus einer Bromcyanspaltung von Cm- α GPDH

Biogel P-2 (-400 mesh)
0,8 x 150 cm
10% Essigsäure
1,8 ml/h

Peak X wurde vor Aminosäurenanalyse (Tabelle 13) weiter gereinigt:

Biogel P-2 (-400 mesh)
0,4 x 150 cm
1% Pyridin
0,54 ml/h

Schritt	30	31	32	33
Asx	++	+		
Thr	+	+		
Ser	++	+	+	
Hse	+++	+++	+	
Glx	0,97	0,94	+	+
Gly	+++	++		
Ala	+	+		
Val	+	+		
Leu	0,85	0,88	++	+
Lys	+			
Hse> ?				+++
Mengenverhältnis	2	1		

Tabelle 13 Aminosäurenanalysen der Spaltprodukte der Schritte 30-33 aus dem Edman-Abbau von DITC-Glas-gekoppeltem Cm-D_{1/I}

In der Aminosäurenanalyse eines mit Amino-peptidase M verdauten Aliquots des in Schritt 30 gewonnenen Tripeptids wurde ausschließlich Leu, Gln und Hse nachgewiesen.

Bei einer Rechromatographie der Hauptfraktion E aus einer Brom-cyanspaltung der Cm- α GPdH (Abbildung 25) wurde ein Peptid X mit dem N-Terminus Gly isoliert, dessen Aminosäurezusammensetzung auf die ersten 8 Positionen von D_{1/I} paßte (Tabelle 14).

Asx	1,14	1
Thr	0,12	
Ser	0,86	1
Hse	+	
Glx	1,14	1
Gly	0,94	1
Ala	1,85	2
Val	0,91	1
Ile	0,65	1
Leu	0,28	
Tyr	0,10	
Phe	0,13	
Lys	0,14	

Tabelle 14 Aminosäurenanalyse von Peptid X aus einer Rechromatographie der Hauptfraktion E (Abbildung 25)

Gly-Ala-Asn-Ile-Ala-Ser-Glu-Val-Ala-(Asp-

Ein Abbaubersuch nach Aktivierung des Fragments mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und Kopplung an APG erbrachte kein Ergebnis. Möglicherweise war das Peptid nicht gebunden; eine Bestimmung der Kopplungsausbeute war in diesem Fall nicht vorgenommen worden.

Obwohl mit dem Ala-Wert der Aminosäurenanalyse nicht in Übereinklang zu bringen, dürfte es sich bei dem Fragment Gly₁-Ala₉ am ehesten um das Produkt einer Acidolyse der Bindung -Ala-Asp- gehandelt haben. Bemerkenswerterweise trat in dem Bromcyanspaltansatz, aus dem das Fragment isoliert wurde, das bereits beschriebene Acidolyseprodukt E₁ nicht auf.

5.6.3. Sequenzierung von D_{1/II}

Verschiedene Präparate von Cm- bzw. Aet-D_{1/II} wurden nach der Lacton-Kopplungsmethode an APG gebunden und jeweils bis zum C-Terminus sequenziert:

D _{1/II}	Leu-Asn-Gly-Gln-Lys-Leu-Gln-Gly-Pro-
	-Glu-Thr-Ala-Arg-Glu-Leu-His-Ser-Ile-
	-Leu-Gln-His-Lys-Gly-Leu-Val-Asp-Trp-
	-Phe-Pro-Leu-Phe-Met

Um die Tauglichkeit der Strategie, durch enzymatische Spaltung längerer, trägerfixierter Peptide definierte, und infolge ihrer Kürze auch total sequenzierbare Restpeptide zu erhalten, an einem weiteren Modellpeptid zu prüfen, wurde die in Experiment I an Cm-D₂ durchgeführte Prozedur (S. 75) an einer Probe von Aet-D_{1/II} wiederholt: das Bromcyanpeptid wurde über sein Homoserin an APG gekoppelt und mit TPCK-Trypsin verdaut. Die freigesetzten Fragmente wurden ausgewaschen und die am Träger

verbliebenen Peptide sequenziert. Die Analyse der Abbauschritte erlaubte die eindeutige Identifizierung des C-terminalen Dekapeptids Gly₂₃-Hse₃₂.

5.7. Isolierung und Sequenzierung des Bromcyanpeptids C

5.7.1. Isolierung von C

Das Vorgehen zur Reindarstellung von C richtete sich nach dem jeweiligen, von der Konzentration der Ameisensäure abhängigen Assoziationsverhalten des ähnlich großen Bromcyanpeptids prä-A:

dieses bildet bei Konzentrationen bis 40% ein homogenes Aggregat, welches bei Konzentrationen >40% zunehmend wieder in seine Monomere zerfällt. Bei der Gelchromatographie äußerte sich dieses Phänomen folgendermaßen: in der Aggregat-Form verließ prä-A als erste Hauptfraktion noch vor A und B die Säule (Abbildung 10, Mitte), in der Monomer-Form wurde es zusammen mit C im Fraktionierungsbereich des Gels eluiert (Abbildung 11, Oben). Im ersteren Fall genügte zur Nachreinigung von C eine Rechromatographie im gleichen System (Abbildung 26), im letzteren wurde die Neigung von prä-A zur Aggregatbildung in verdünnter Ameisensäure bewußt zur gleichzeitigen Isolierung beider Peptide ausgenützt (Abbildung 27).

Die Untersuchung von Nebenfraktionen aus Rechromatographien von C zeigte, daß auch dieses Bromcyanpeptid in weniger konzentrierter Essigsäure zur Bildung homogener Aggregate neigt (Abbildung 27, Unten); im Unterschied von prä-A sind diese jedoch aus Oligomeren (am ehesten Di- oder Trimeren) zusammengesetzt. Mengenmäßig machte das aggregierte Material in keinem Fall mehr als 10% der Ausgangsmenge aus.

Hauptfraktion C
(Abbildung 10, Mitte)

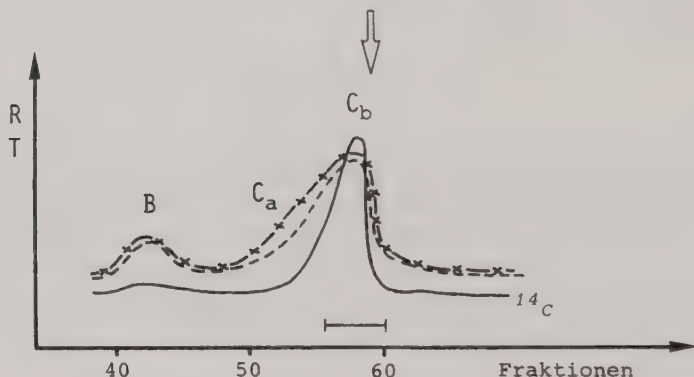


Abbildung 26 Rechromatogramm der Hauptfraktion C aus der Bromcyanspaltung von ^{14}Cm - α GPDH

Sephadex G-75 fine
0,8 x 150 cm
30% Ameisensäure
1,8 ml/h

Die Aminosäurezusammensetzung des gereinigten Bromcyanpeptids C wurde bestimmt (Tabelle 15). In einer großen Zahl von Analysen schwankten die Werte für Asx, Phe und His zwischen 2-3 bzw. 3-4 bzw. 0-1 per Molekül. Auch die Anfertigung von 24-, 60- und 120h-Hydrolysen erlaubten wegen der unsystematischen Streuung der Werte keine Extrapolation auf einheitliche Zahlen. Für Ala wurden mit hoher Konstanz 6 Reste/Mo-

Oben Sephadex G-50 sf.
0,1 M Ammoniumacetat pH 4,8
0,8 x 150 cm
2,16 ml/h

Unten Biogel P-30 (-400 mesh)
0,6 x 150 cm
10% Essigsäure
1,08 ml/h

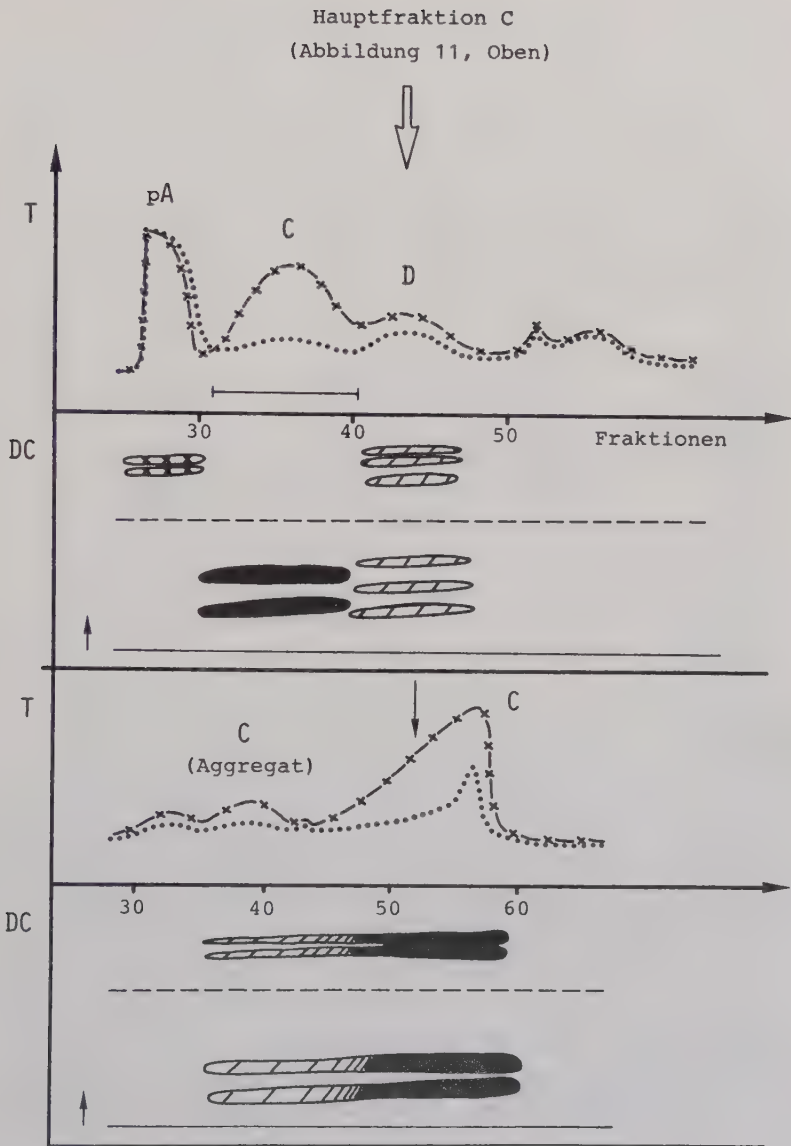


Abbildung 27

Rechromatogramme der Hauptfraktion C aus der Bromcyanspaltung von Aet- α GPDH

lekül gefunden. Die endgültige Zahl dieser Aminosäuren konnte nur über die Sequenzbestimmung festgelegt werden.

	Cm-C			Aet-C	
	24h	60h	120h	30h	
Cys (Cm)	+	0,19	+		
Asx	2,13	2,34	2,19	2,20	2
Thr	3,58	3,42	3,18	3,58	4
Ser	3,15	3,16	2,74	3,28	4
Hse	++	++	++	+++	1
Glx	6,44	6,30	6,24	6,10	6
Pro	1,74	1,84	1,64	1,86	2
Gly	4,54	4,78	4,58	4,87	5
Ala	6,28	6,09	6,04	6,44	7
Cys-2	1,56	1,42	0,80		3
Val	3,15	3,02	3,03	3,20	3
Ile	2,95	2,94	2,89	2,66	3
Leu	4,05	3,95	3,93	3,74	4
Tyr	0,92	0,97	0,99	n.v.	1
Phe	3,43	3,89	3,78	4,16	4
Lys	3,63	3,79	3,83	4,03	4
Cys (Aet)				2,96	
His	+	0,30	1,02	+	
Hse>	+	+	+	+	
Arg	2,98	2,81	2,76	3,24	3
Gesamt					56
N-Term.					Ile

Tabelle 15 Aminosäurenanalysen von Cm- und Aet-C

Unsicherheiten bei Analysen größerer Peptide entstanden durch gelegentlich beträchtliche Schwankungen der Färbefaktoren bei Verwendung verschiedener Ionenaustauschersäulen und nach Neufüllungen des Ninhydrinreservoirs. Diesen Veränderungen wurde jedoch durch eine Neubestimmung der Faktoren mit Hilfe von Standardläufen nicht immer Rechnung getragen. Darüberhinaus wurde die Bestimmung der basischen Aminosäuren getrennt von der der sauren und neutralen durchgeführt, wodurch zusätzliche Fehlermöglichkeiten durch mangelnde Reproduzierbarkeit bei der Probenapplikation in die Quantifizierung eingingen.

5.7.2. Sequenzierung von C

C ist das zweitgrößte Bromcyanpeptid der α GPDH (56 Reste). Einige Versuche, seine Aminosäuresequenz durch Edman-Abbaun über seine gesamte Länge zu ermitteln, scheiterten; es gelang aber die nahezu vollständige Lokalisierung der 4 Lys und 3 Arg. Ihre Verteilung im Peptid und ihre Lage zueinander ließ den Versuch aussichtsreich erscheinen, nach der am Modellpeptid Cm-D₂ erprobten Strategie der tryptischen Spaltung trägergebundener Peptide Zugang zu den Sequenzen der C-terminalen Peptidhälfte zu erhalten.

Das experimentelle Vorgehen erfolgte ebenfalls in 3 Etappen:

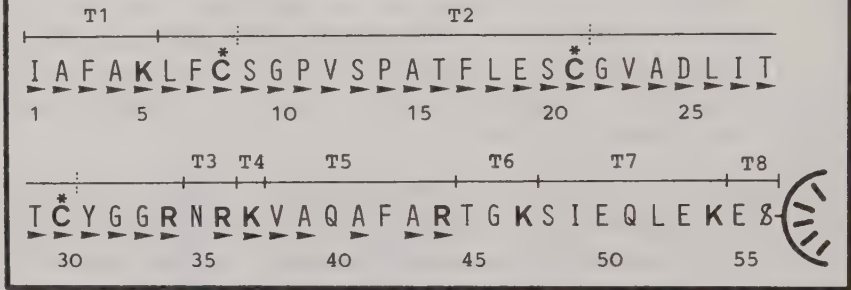
1. Zunächst wurde angestrebt, durch mehrere Abbauten unterschiedlich trägergebundener Peptidproben möglichst viele Positionen zu identifizieren (Abbildung 28).
2. Die auf diese Weise erarbeitete Sequenz war im C-terminalen Drittel lückenhaft. Deshalb wurden weitere Aliquots nach der Homoserinlacton-Methode an APG gekoppelt, zur Beschränkung der tryptischen Spaltstellen auf Arg-Bindungen mit 4-Sulfophenyl-isothiocyanat (SPITC) [340] bzw. dBdC umgesetzt und tryptisch verdaut. Erwartungsgemäß blieb das durch Hydrolyse der letzten Arg-Bindung entstandene Spaltstück nach dem Waschen des Glases am Träger zurück und konnte bis zum Homoserin problemlos durchsequenziert werden (Abbildung 28).
3. Die vom Träger abgespaltenen, im Waschwasser gesammelten Fragmente wurden gelfiltriert, die isolierten Komponenten charakterisiert und, soweit nötig, nach der Dansyl-Edman-Methode [341,342] manuell sequenziert (Abbildungen 28 u. 29; Tabelle 16).

Durch Einsatz bzw. Kombination verschiedener Kopplungsverfahren, wie Homoserinlacton-Kopplung, Homoserinlacton-Kopplung mit nachträglicher Zugabe von DITC-Glas, DITC-Kopplung, sollten möglichst hohe Kopplungsausbeuten erzielt werden. In einem Fall wurde ein Gemisch aus Homoserinlacton-gekoppeltem Aet-C und DITC-gekoppeltem Cm-C zum Abbau gegeben.

Bromcyan-peptid C
(Cm- bzw. Aet-)

- (a) Homoserinlacton-Kopplung bzw.
(b) DITC-Kopplung bzw.
(a) + (b)

Sequenzierung



(I) Aet-C

1. Hse>-Kopplung
dBdC bzw. SPITC
2. Tryptische Spaltung

(II) Cm-C

- Hse>/DITC-Kopplung
- Tryptische Spaltung

3. Sequenzierung der nach dem Waschen des Glases am Träger verbliebenen Peptide



4. Peptide des Waschwassers (I)

I A F A K L F C S G P V S P A T F T1-T2
L E S C G V A D L I T T C Y G G R
V A Q A F A R T4-T5
N R T3

Die eingesetzten Peptidmengen lagen zwischen 250 und 600 nMol. Die Kopplungsausbeuten schwankten zwischen 20 und 80%.

Unabhängig von den jeweiligen Spaltungsbedingungen verliefen die tryptischen Verdauungen spezifisch und mit guten Ausbeuten. Ein Überschuß an Enzym ist, wie auch künftige Erfahrungen zeigten, keinesfalls notwendig; er birgt vielmehr die Gefahr unerwünschter chymotryptischer Aktivität.

Interessant ist das wechselnde Ausmaß der Hydrolyse der Arg₄₄-Bindung bei Einsatz vergleichbarer Mengen (ca. 400 nMol) an tBoc-Aet-C (nahezu 100%), SPtc-Aet-C (75%) und unmodifiziertem Aet-C (60%) unter identischen Spaltungsbedingungen. Die Ausbeuten an den übrigen trypsinsensitiven Bindungen (Arg_{34,36}) lagen, unabhängig von der Natur des Aminogruppen-blockierenden Agens, bei 80%.

Aus der tryptischen Spaltung von Lacton-/DITC-gekoppeltem Cm-C resultierten die Fragmente T7-T8 (Hauptfragment) und T6-T7-T8 (Nebenfragment). Sie wiesen auf eine nahezu quantitative Fixierung von Lys₅₄ (DITC-gekoppelt) und Hse₅₆ (Lacton-gekoppelt) hin, während Lys₄₇ offenbar weitgehend unverankert und deshalb von Trypsin angreifbar war.

Die Schritte 7 und 11 aus dem Abbau des trägerfixierten Peptids T6-T7 (mit Braunitzer I-Reagens umgesetztes, Trypsin-behandeltes Aet-C) fielen durch eine intensive Gelbfärbung auf (Gln₅₁ und Glu₅₅, nicht aber Glu₄₉ und Glu₅₃). Bei der MS-Analyse trat ein neues Signal bei m/e = 280 auf. Eine Erklärung hierfür konnte bis jetzt nicht gefunden werden.

Abbildung 28 Sequenzierungsschema für das Bromcyanpeptid C

<u>E</u>	beim automatischen Edman-Abbau identifizierte Position
<u>E</u>	" manuellen " " " "
RC	trypsinaffine Aminosäurenreste
*C	Cys(Cm) * C bzw. Cys(Aet) C

Aus der Kenntnis der Aminosäurezusammensetzung von C und der aus den automatischen Edman-Abbauten ermittelten N- und C-terminalen Sequenzen ließen sich Zahl und Art der Reste zwischen Arg₃₄ und Arg₄₄ mit hoher Sicherheit angeben. Die Aminosäureanalysen von Spitzenfraktionen der Peaks aus der gelchromatographischen Auftrennung der vom Träger freigesetzten, tryptischen Fragmente (Abbildung 29, Oben) zeigten jedoch erhebliche Abweichungen von den erwarteten Werten (Tabelle 16). Der Grund hierfür lag in einer Verunreinigung der Fraktionen durch Peptidmaterial unbekannter Herkunft.

Bei der Charakterisierung der nachgereinigten Peptide fiel auf, daß zwei von ihnen ([E] und [Q] in Abbildung 29, Oben) trotz unterschiedlichen Verhaltens in der Gel- und Dünnschichtchromatographie identische Aminosäureanalysen zeigten. Ihr manu-

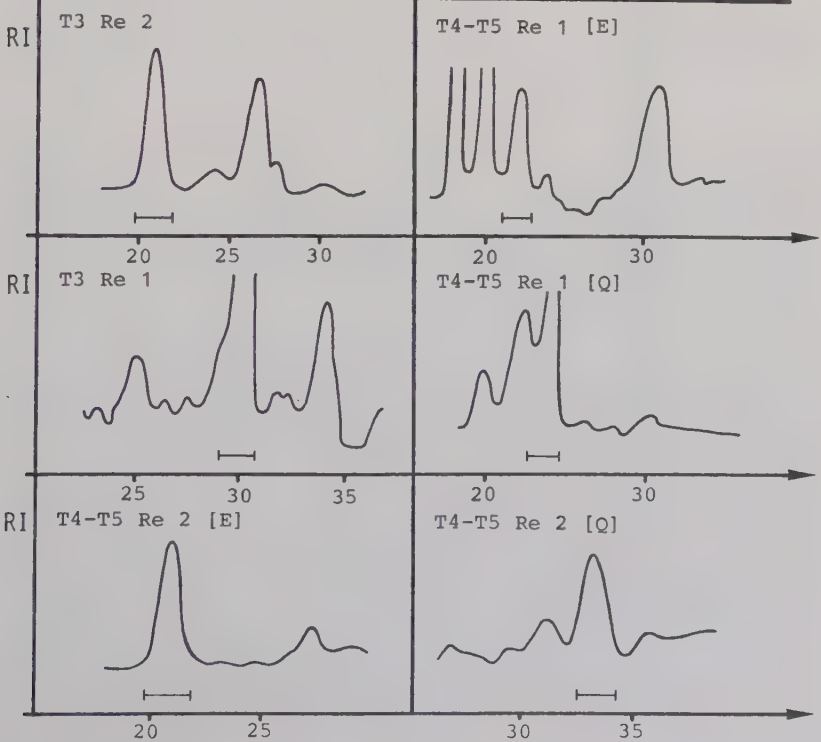
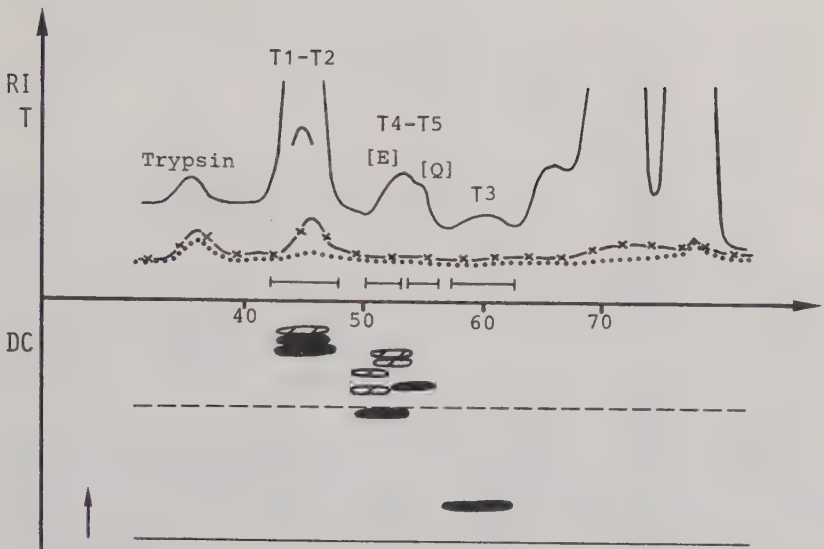
Abbildung 29

Oben Gelchromatogramm der durch tryptische Spaltung von glasgebundenem ^tBoc-Aet-C freigesetzten Fragmente

Biogel P-30 (-400 mesh)
0,5 x 150 cm
80% Ameisensäure
0,78 ml/h

Mitte Rechromatogramme der Peptide T4-T5[E], T4-T5[Q] und T3
Unten

T4-T5[E]	Re 1	Biogel P-2 (-400 mesh)
	Re 2	0,3 x 150 cm
T4-T5[Q]	Re 1	30% Ameisensäure
T3	Re 1	0,48 ml/h
T4-T5[Q]	Re 2	Biogel P-4 (-400 mesh)
		0,3 x 150 cm
		20% Ameisensäure
		0,39 ml/h
T3	Re 2	Biogel P-2 (-400 mesh)
		0,3 x 150 cm
		80% Ameisensäure
		0,48 ml/h



	Träger- peptid T6-T7-T8	T1-T2	[E]		[Q]		T3		C
			T4-T5	Re	T4-T5	Re	Re	Re	
Asx	0,17	0,94	1	0,62	0,20	0,46	+	1,44	2
Thr	0,77	2,63	3	0,64	0,16	0,32	+	0,17	4
Ser	0,84	2,68	3	0,49	0,41	0,54	0,30	++	4
Hse	++			+				++	4
Glx	3,72	0,95	1	2,05	1,03	1,50	1,01	++	1
Pro		1,98	2	0,41	+			+	6
GLY	1,00	4,24	4	1,26	0,26	0,58	0,19	+	2
Ala	0,24	3,76	4	1,84	2,96	2,26	2,88	0,97	5
Val	0,16	1,91	2	0,77	0,99	0,92	0,90	0,47	7
Ile	0,93	1,50	2	0,31	+	0,16	+	0,10	3
Leu	0,99	2,69	3	1,00	0,22	0,36	0,19	0,19	3
Tyr		0,49	1			+		0,20	4
Phe	0,11	2,63	3	0,69	0,92	1,00	1,00	0,23	1
Lys	2,13	1,01	1	1,04	0,84	1,18	0,76	+	4
Cys(Aet)	0,12	2,77	3	0,19	+	0,16		0,26	4
Hse>	+	+		+	+	0,14		+	3
Arg	+	0,92	1	0,80	0,65	0,92	0,74	+	
Gesamt	12	34			8		8	2,24	1
N-Term.	Thr	Ile			Lys		Lys	0,86	2
									56
									Ile

Tabelle 16 Aminosäureanalysen der durch tryptische Spaltung von glasgebundenem tBoc-Aet-C entstandenen Fragmente vor und nach Chromatographie (Re)

eller Abbau nach Edman führte zu folgenden Sequenzen:

T4-T5	[E]	Lys-Val-Ala-Glu-Ala-Phe-Ala-Arg
	[Q]	Lys-Val-Ala-Gln-Ala-Phe-Ala-Arg

Die Unterscheidung Säure/Säureamid gelang durch DC der Aminosäuren-Pth's im System von Kulbe [243]. Der ^tBoc-Rest der ε-NH₂-Gruppe von Lys wurde durch Säurebehandlung entfernt.

Da weder Aggregation noch das Vorhandensein einer prosthetischen oder sonstigen chemischen Gruppierung für das unterschiedliche Laufverhalten verantwortlich gemacht werden kann, ist der Grund dafür offensichtlich einzig im Unterschied Säure/Säureamid an Position 4 (Glu/Gln) zu suchen. Erstaunlich ist die Auflösung der verwendeten analytischen Systeme, die, gemessen an der Größe der Peptide, eine derart geringe Differenz noch erfassen. Gln wird durch die häufige Behandlung mit organischen Säuren desamidiert.

DC- und MS-Nachweis von Asn-Pth aus dem manuellen Edman-Abbau des Dipeptids T3 ergab die Sequenz:

T3 Asn-Arg

Bei Cochromatographie dieses Fragments mit dem tryptischen Spaltstück Asn-Arg aus Hypertensin wanderten auf der DC-Platte beide Substanzen mit derselben Geschwindigkeit.

Zur Absicherung der C-terminalen Sequenzen des Fragments T1-T2 wurde folgendes Verfahren gewählt: ^tBoc-T1-T2 (100 nMol) wurde mit Dansylchlorid umgesetzt, das Reaktionsprodukt ^tBoc-o-Dns-Tyr-T1-T2 gelchromatographisch gereinigt (Abbildung 30) und anschließend chymotryptisch verdaut. Die Spaltungslösung wurde auf 100°C erhitzt, angesäuert, ungelöstes Material abzentrifugiert und der Überstand eingetrocknet. Der Rückstand wurde in 50% Pyridin gelöst und mit PITC umgesetzt. Dadurch sollte erreicht werden, daß bei Lösung des eingetrockneten Reaktionsgemisches in 60% Ethanol lediglich das Arg enthaltende, C-terminale Spaltstück als Kation vorliegt. Dieses ließ sich an einen Kationenaustauscher adsorbieren und

durch Waschen des Harzes von sauren und neutralen Substanzen abtrennen. Nach Chromatographie der Lösung auf Dowex 50W-X2 wurde das Harz bei 37°C 30 min lang in 100% Ameisensäure inkubiert und anschließend mit einem Gemisch aus Methanol und Ameisensäure (50:50 v/v) ausgewaschen. Das eingetrocknete Filtrat enthielt die abgespaltene, N-terminale Aminosäure, Ile, in Form des Pth-Derivats, das durch DC- und MS-Analyse eindeutig und als einziger Rest nachgewiesen werden konnte.

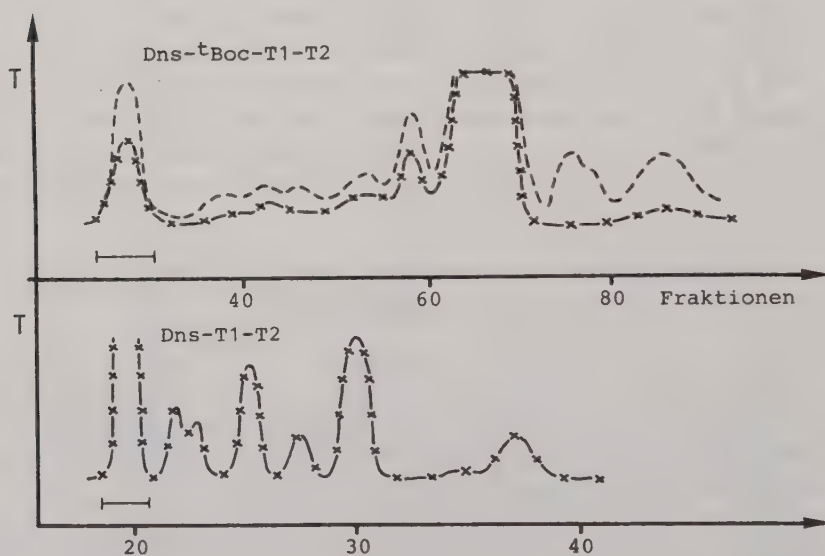


Abbildung 30 Gelchromatogramm des Reaktionsprodukts aus der Umsetzung von $t\text{Boc-T1-T2}$ (aus Aet-C) mit Dansylchlorid

- | | |
|-------|--|
| Oben | Ammoniumhydrogencarbonat-löslicher Teil
Biogel P-4 (-400 mesh)
0,4 x 150 cm
0,1 M Ammoniumhydrogen-
carbonat pH 8,6
0,54 ml/h |
| Unten | Ammoniumhydrogencarbonat-unlöslicher Teil
Biogel P-2 (-400 mesh)
0,3 x 150 cm
80% Ameisensäure
0,48 ml/h |

Das Restpeptid wurde durch Waschen des Harzes mit 30% Ethanol, 1 M an Pyridiniumtrifluoracetat pH 9,0, desorbiert. Daß es sich dabei tatsächlich um das um die N-terminale Aminosäure verkürzte, C-terminale chymotryptische Fragment des ursprünglich tryptischen Spaltpeptids T1-T2 handelte, konnte nach Totalhydrolyse eines Aliquots durch DC-Nachweis von o-Dns-Tyr bewiesen werden. Für das vorliegende Peptid wurde mit Hilfe der Dansyl-Edman- und später auch der 4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat (DABITC)/PITC-Doppelkopplungsmethode nach Chang [344] im Handabbau folgende Sequenz ermittelt:

Thr-Thr-Cys-Tyr-Gly-Gly-Arg

Die Reihenfolge der tryptischen Peptide von t Boc-Aet-C ergab sich mühelos aus der Kenntnis der Arg-Positionen, deren Festlegung bereits bei den ersten automatischen Edman-Abbauten von C gelang.

In den meisten Rechromatogrammen präparativer Mengen von C fiel der Hauptpeak durch eine ausgeprägte Asymmetrie auf (Abbildung 26). Aus den während des Peakanstiegs eluierten Fraktionen wurden Aliquots entnommen und dansyliert, um durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren einen Hinweis auf die Existenz mehrerer Komponenten zu erhalten. Neben Ile wurde reproduzierbar Leu gefunden; der Peak C wurde infolgedessen über lange Zeit in 2 Abschnitte aufgeteilt: C_a (Ile, Leu) und C_b (Ile). Aminosäurenanalysen gaben im wesentlichen die Zusammensetzung von C wieder. Neu war das Auftreten von His und in einigen Fällen höherer Leu-Werte (Tabelle 17).

Ein Edman-Abbau von ca. 25 nMol C_a -Peptid (APG/DITC-Mischkopplung) lieferte folgende Paralleelsequenz:

Schritt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C_a	Leu-	-Gly-		-Gly-	-Gly-										
		Ala		Ala	Leu										
C_b	Ile-	-Phe-		-Lys-	-Phe-	Cys-	Ser-	Gly-		-Val-		-Pro-	Ala-		
								(Cm)							

Eine Identifizierung des Peptids an Hand bekannter α GPDH-Sequenzen ist bisher nicht gelungen.

	Cys (Cm) - C _a		Cys (Aet) - C _a		C _b = C
Cys (Cm)	0,76				3
Asx	3,04	3	2,40	2-	2
Thr	1,80	2	2,65	3	4
Ser	2,68	3	2,35	3	4
Hse	+	1			1
Glx	5,92	6	6,85	7	6
Pro	2,64	2-	n.v.		2
Gly	4,64	5	4,35	4-	5
Ala	3,36	3-	4,25	4-	7
Cys-2	0,80				
Val	2,76	3	2,30	2-	3
Met	+				
Ile	2,52	3	2,30	3	3
Leu	4,28	4-	5,40	6	4
Tyr	1,20	1	0,85	1	1
Phe	2,32	3	3,10	3	4
Lys	4,06	4	4,24	4	4
Cys (Aet)			1,35		
His	1,88	2	1,24	1-	0
Hse>	+				
Arg	2,35	3	2,53	3	3
N-Term.			Leu		
			Ile		Ile

Tabelle 17 Aminosäurenanalysen von Cm-C_a und Aet-C_a aus der ansteigenden Flanke des Hauptpeaks C und zum Vergleich die Aminosäurezusammensetzung von C_D (=C) (24h-Hydrolysen)

5.8. Isolierung und Teilsequenzierung des Bromcyanpeptids prä-A

5.8.1. Isolierung von prä-A

Nahezu 3/4 der αGPDH-Sequenz waren bereits aufgeklärt, als prä-A entdeckt und als eines der 9 Bromcyanpeptide der αGPDH zweifelsfrei identifiziert wurde. Die Tatsache, daß dieses Peptid lange Zeit unserer Aufmerksamkeit entging, erklärt sich durch sein ungewöhnliches Verhalten: seine Neigung

zur Aggregatbildung und seine außerordentlich geringe Fluorogenität nach Umsetzung mit Fluorescamin.

Der N-Terminus des Peptids war durch Zyklisierung von Gln zur 5-Pyrrolidon-2-carbonsäure für aminofunktionelle Reagentien blockiert. Die einzigen reaktiven Gruppen wurden von den ϵ -NH₂-Gruppen zweier Lysine gestellt, deren Reaktionsprodukt mit Fluorescamin einen nur geringen Beitrag zur Emissionsintensität der Peptidbande bei DC-Analyse leistete, zu gering, um unter den üblichen Bedingungen der Eluat-Analyse primärer Auftrennungen von Bromcyanfragmenten zu einer sichtbaren Bande zu führen.

In verdünnten organischen Säuren bildete präA ein Aggregat, welches bei Gelfiltration der Bromcyan-Spaltgemische in 30% Ameisensäure im Ausschlußvolumen, häufig zusammen mit der heterogenen Hauptfraktion A, eluiert wurde und ein Molekulargewicht von >10000 simulierte. In diesem Fraktionierungsbereich wurde jedoch nicht mehr mit dem Auftreten eines "echten" Bromcyanpeptids gerechnet, auch dann nicht, als nach fast abgeschlossener Sequenzierung der Peptide B, C, D_{1/I}, D_{1/II}, D₂, E₁ (seine Entstehung durch Acidolyse des N-terminalen Bromcyanpeptids war noch nicht erkannt), E₂ und E₃, von denen keines einen blockierten N-Terminus aufwies, ein weiteres, und zwar das eben erwähnte N-terminale, acetylierte Bromcyanpeptid der α GPDH noch nicht gefunden war. Dessen Molekulargewicht aber sollte aus rein rechnerischen Gründen nicht größer als jenes von B sein. Trotz intensiver Suche gelang es in der Folge nicht, dieses Fragment zu finden.

Bei genauem Studium früher Chromatogramme von Bromcyan-Spaltgemischen fiel in einigen Fällen an der linken Flanke der Hauptfraktion A eine Schulterbildung unterschiedlichen Grades mit Inversion der Transmission bei 253 und 280 nm auf (Abbildung 10, Mitte). Das Ausmaß dieser Partialtrennung hing jedoch sehr stark von Typ und Porengröße des verwendeten Gels ab. Wie bereits erwähnt, wurde dieser mit präA bezeichnete Peak, vor allem bei späteren Gelfiltrationen auf Biogel P-30 (100-200 mesh), vollkommen von A überlagert und war trotz seines charak-

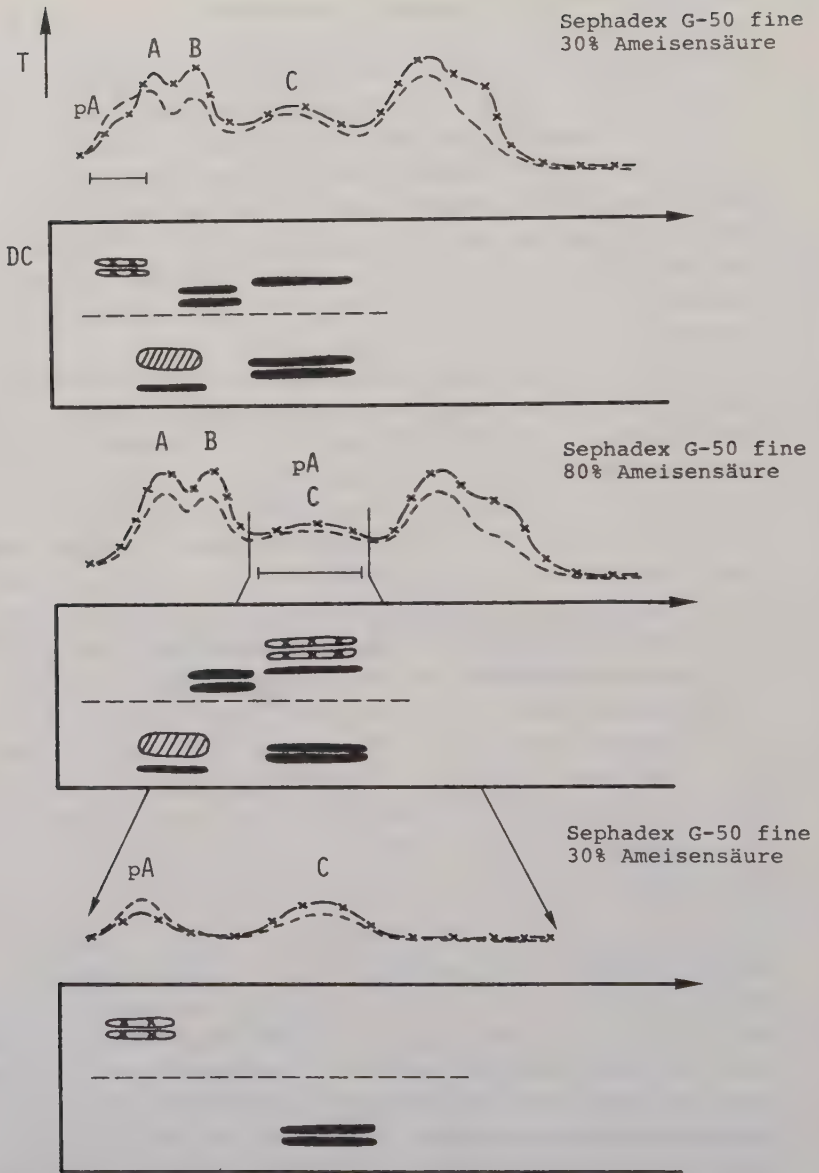


Abbildung 31

Aggregationsverhalten von *prä-A*

in 30% Ameisensäure
in 80% Ameisensäure

in Polymer-Form
in Monomer-Form

teristischen Transmissionsprofils nicht mehr lokalisierbar. Bei der Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese dieser Region ließ sich eine Komponente abtrennen, die kleiner war als B [301] und bei der Endgruppenbestimmung keine N-terminale Aminosäure lieferte, was zu der Vermutung Anlaß gab, es handle sich möglicherweise um das gesuchte N-terminale, acetylierte Bromcyanpeptid.

Die gezielte Untersuchung der Bedingungen, unter denen Aggregatbildung auftritt, führte zur Entwicklung eines einfachen Verfahrens zur Reindarstellung des Peptids (Abbildung 31). Als sich herausstellte, daß es jedoch nicht 90, sondern nur ca. 50 Aminosäuren umfaßte (Tabelle 18), zudem wiederholt N-terminales Glx nach Dansylierung einer Triethylamin-behandelten Probe gefunden wurde, war offenkundig, daß die Komponente prä-A nicht das N-terminale Bromcyanpeptid sein konnte. Bald darauf gelang der Nachweis, daß letzteres bereits bei der Ent-

	Cm-prä-A			Aet-prä-A			
	24h	60h	120h	24h	72h	120h	
Cys (Cm)	+	+	+				
Asx	5,91	5,60	5,24	6,00	5,91	5,86	6
Thr	3,78	3,44	2,99	3,81	3,73	3,62	4
Ser	0,43	0,33	0,27	0,27	0,24	0,32	-1
Hse	++	++	++	++	++	++	1
Glx	4,62	4,27	4,01	4,68	4,57	4,65	4-
Pro	0,99	0,97	0,94	1,19	1,05	1,05	1
Gly	6,83	6,92	6,84	6,97	6,97	6,83	7
Ala	5,08	5,10	4,98	5,15	5,14	5,05	5
Cys-2	0,83	0,50	0,12				2
Val	5,73	6,42	6,77	5,52	6,61	6,75	7
Ile	3,16	3,46	3,68	2,96	3,81	3,89	4
Leu	4,04	4,00	4,02	4,07	4,01	4,09	4
Phe	2,94	2,96	2,91	2,88	2,54	2,52	3
Lys	2,23	2,13	2,12	2,19	2,25	2,06	2
Cys (Aet)				1,77	1,49	1,57	
His	+	+	+	+	+	+	
Hse>	++	++	++	++	++	++	
Arg	1,87	1,92	1,90	1,84	2,12	1,95	2
Gesamt							52 (+2)
N-Term.							(Glx)

Tabelle 18

Aminosäurenanalysen des Bromcyanpeptids prä-A

salzung der kommerziellen α GPDH-Präparate in 80% Ameisensäure, bzw. beim Einrotieren der entsalzten Enzymfraktionen unter erhöhter Temperatur, durch Acidolyse einer -Asp-Pro-Bindung entstand und das Fragment E_1 sein C-terminales Bruchstück darstellte.

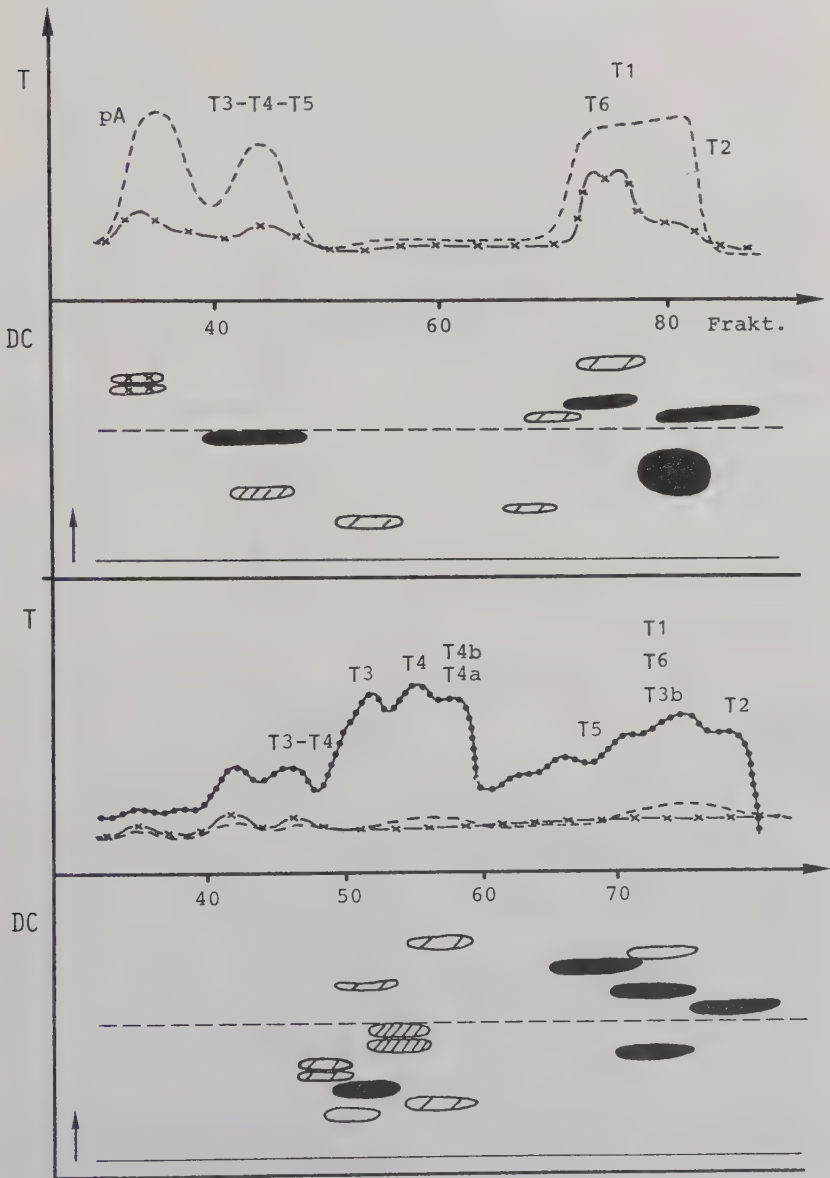
Von prä-A fielen nur 20-30% der erwarteten Menge bei den Bromcyanspaltungen an. Es gibt Hinweise, daß die restlichen 70-80% zusammen mit wechselnden Anteilen der Peptide NT- E_1 , E_1 , B und $D_{1/I}$ die heterogene Hauptfraktion A bildeten. Lediglich die Fragmente C, $D_{1/II}$ und D_2 ließen sich reproduzierbar mit hohen Ausbeuten gewinnen.

5.8.2. Teilsequenzierung von prä-A

Eine Ansequenzierung von Lacton-gekoppeltem prä-A kam wegen des blockierten N-Terminus (5-Pyrrolidon-2-carbonsäure) nicht in Betracht. Selbst bei zugänglichem Aminoende wäre es bei Koppungsausbeuten von 10-20%, wie sie sich in Testversuchen ergaben, wenig erfolversprechend gewesen, einen Abbau über die gesamte Länge des Peptids zu versuchen. Auch der Abbau des nach tryptischer Verdauung von Lacton-gekoppeltem prä-A vorliegenden C-terminalen Restpeptids hätte nur im günstigsten Fall, d.h. mit einer nur geringen Wahrscheinlichkeit, bis zum Peptidende durchgeführt werden können. Vorversuche im analytischen Maßstab mußten wegen der geringen Ausgangsmengen auf ein Minimum beschränkt werden.

Abbildung 32 Gelchromatogramme der tryptischen Peptide von CT-Cm-prä-A (Oben) und CT-Aet-prä-A (Unten)

Sephadex G-50 sf.
0,8 x 150 cm
0,1 M Ammoniumhydrogen-
carbonat pH 8,6
1,8 ml/h



Als Ausweg blieb die Fragmentierung des mit CTA Lys-blockierten Peptids durch Trypsin und die separate Sequenzierung der Spaltstücke. Die DC-Analyse der gelchromatographischen Auftrennung (Abbildung 32, Oben) zeigte neben einer geringen Menge ungespaltenen prä-A's erwartungsgemäß 3 Peptide, von denen jedoch jedes unerwarteterweise eine nachweisbare Endgruppe besaß (Ile, Phe, Leu). Das Rätsel um den Verbleib des N-terminalen, blockierten Fragments lösten Mitarbeiter, welche später im Eluat das Fluorescamin-negative Peptid T1 fanden. Aus seiner Zusammensetzung mußte auf eine Unspezifität von Trypsin bzw. andersweitige enzymatische Aktivität geschlossen werden (Tabelle 19).

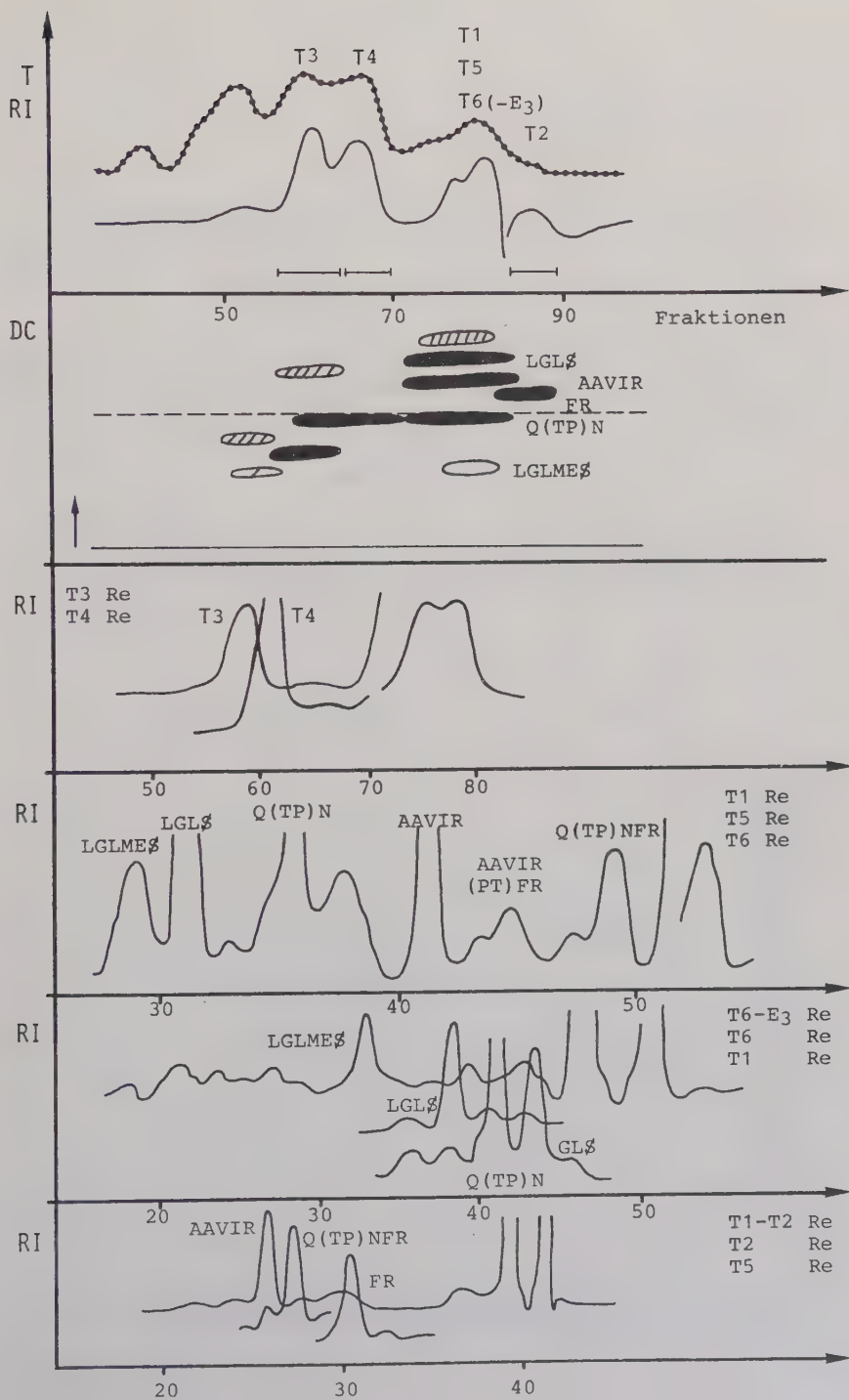
Für eines dieser Peptide konnte nach Aminosäurenanalyse sofort

Abbildung 33 Gelchromatogramm der tryptischen Peptide aus Cm-prä-A (Oben)

Sephadex G-50 sf.
0,6 x 150 cm
0,1 M Ammoniumhydrogen-
carbonat pH 8,6
0,9 ml/h

Rechromatogramme (Mitte, Unten)

T3,T4	Sephadex G-50 sf. 0,6 x 150 cm 10% Essigsäure 1,08 ml/h
T1,T5,T6	Biogel P-2 (-400 mesh) 0,5 x 150 cm 0,1 M Ammoniumhydrogen- carbonat pH 8,6 0,54 ml/h
T6-E ₃ T6 T1	Biogel P-4 (-400 mesh) 0,3 x 150 cm 20% Ameisensäure 0,39 ml/h
T1-T2 T2 T5	Biogel P-2 (-400 mesh) 0,3 x 150 cm 30% Ameisensäure 0,48 ml/h



die Sequenz angegeben werden:

T2 Phe-Arg

Seine Position ließ sich nach Isolierung des ursprünglich erwarteten Peptids T1-T2 (Abbildung 33, Mitte, Unten) bestimmen:

T1-T2 <Glu-(Thr,Pro)-Asn-Phe-Arg

Ein Tetrapeptid, durch den Gehalt an Hse als C-terminales Fragment identifiziert, wurde nach der Dansyl-Edman-Methode manuell sequenziert:

T6 Leu-Gly-Leu-Hse

Aus einer tryptischen Spaltung von Aet-prä-A, die eine Fülle von Fragmenten lieferte, und deren weitere Reinigung mit großen Substanzverlusten verbunden war (Tabelle 20), konnten 2

	T1		T2		T3-T4-T5		T6	
					24h	96h		
Cys (O ₃ H)	+					++		
Cys (Cm)					0,83	+	2	
Asx	1,00	1			4,87	4,66	5	
Thr	0,84	1			2,87	2,07	3	
Ser					+	+		
Hse							+++	1
Glx	1,06	1			3,43	3,19	3	
Pro	0,96	1						
Gly					5,54	5,76	6	0,98 1
Ala					4,60	4,67	5	
Cys-2					++	+		
Val					5,10	6,55	7	
Ile					2,89	3,60	4	
Leu					2,41	2,31	2	1,80 2
Phe			1,08	1	2,09	2,02	2	
Lys					1,74	1,74	2	
Hser>							++	
Arg			0,98	1	0,77	0,79	1	
Gesamt	4		2				42	4
N-Term.	(Glx)		Phe				Ile	Leu

Tabelle 19 Aminosäurenanalysen der tryptischen Peptide von CT-Cm-prä-A

	T1	T2	T3	T3a	T3b	T4	T4a	T4b	T3-T4	T5	T6	prä-A
Cys (O ₃ H)			+++			++			++			
Asx	0,82 1		1,37 1	1,21 1		3,92 4	0,99 1	2,55 3	5,02 5			6
Thr	0,90 1		1,91 2	1,80 2		1,21 1		0,55 1	2,47 3			4
Ser			0,47	0,37		0,54			1,12		+++ 1	1
Hse	0,91 1		2,94 3	3,05 3		0,52		+	3,31 3			4
Glx	0,87 1		+						0,34			1
Pro			1,53 1	0,57	1,10 1	5,22 5	1,78 2	2,91 3	5,97 6		0,96 1	7
Gly			1,25 1	0,27	0,81 1	2,06 2	1,77 2		3,42 3	1,81 2		5
Ala			2,99 4	3,21 4		1,61 2	1,65 2		3,68 6	0,62 1		7
Val			1,75 2	1,73 2		0,81 1		0,79 1	2,16 3	0,60 1		4
Ile			1,08 1	0,16	1,00 1	1,18 1	0,87 1		2,35 2		1,94 2	4
Leu			1,00 1	0,11		1,73 2	1,00 1	1,00 1	2,12 3			3
Phe		1,00 1	0,67 1	0,21	0,76 1	1,00 1		1,11 1	1,97 2			2
Lys			0,15 1	0,73 1		+	0,87 1	+	0,45 2		++	2
Cys (Aet)												
Hse>			0,84 1	+				+	0,24	1,10 1		2
Arg												
Gesamt	4	2	17	13	4	20	10	10	37	5	4	52
N-Term.	(Glx)	Phe	Ile	Ile	Gly	Asx	Asx	Asx	Ile	Ala	Leu (Glx)	

Tabelle 20 Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide von Aet-prä-A

weitere Peptide automatisch (C-terminal bzw. DITC-gekoppelt) und manuell sequenziert werden:

T3b	Gly-Ala-Leu-Lys
T5	Ala-Ala-Val-Ile-Arg

Die beiden längeren Peptide wurden aus einem tryptischen Spaltungsansatz von Cm-prä-A gelchromatographisch isoliert (Abbildung 33). Ihre Zusammensetzung war mit der von T3 und T4 aus der tryptischen Spaltung von Aet-prä-A identisch (Abbildung 32, Unten; Tabelle 20). Während C-terminal bzw. DITC-gekoppeltes T3 bis zum Ende durchsequenziert werden konnte, wurden die Arbeiten an T4 nach Ile₃₆ abgebrochen, nachdem das Pth-Hauptsignal in den folgenden Schritten nicht mehr zweifelsfrei identifiziert werden konnte.

Die Teilsequenz von prä-A lautet:

```

prä-A   Gln(Thr,Pro)Asn-Phe-Arg-Ile-Val-Val-
        -Thr-Gln-Glu-Val-Asn-Thr-Val-Glu-Ile-
        -Cys-Gly-Ala-Leu-Lys-Asx-Leu-Val-Ala-
        -Val-Gly-Ala-Gly-Phe-Cys-Asp-Gly-Ile-
        (Gly,Phe,Gly,Asp,Asn,Thr)Lys-Ala-Ala-
        -Val-Ile-Arg-Leu-Gly-Leu-Met
    
```

Die Sequenz der in Klammern angegebenen Aminosäuren wurde von Mitarbeitern aufgeklärt.

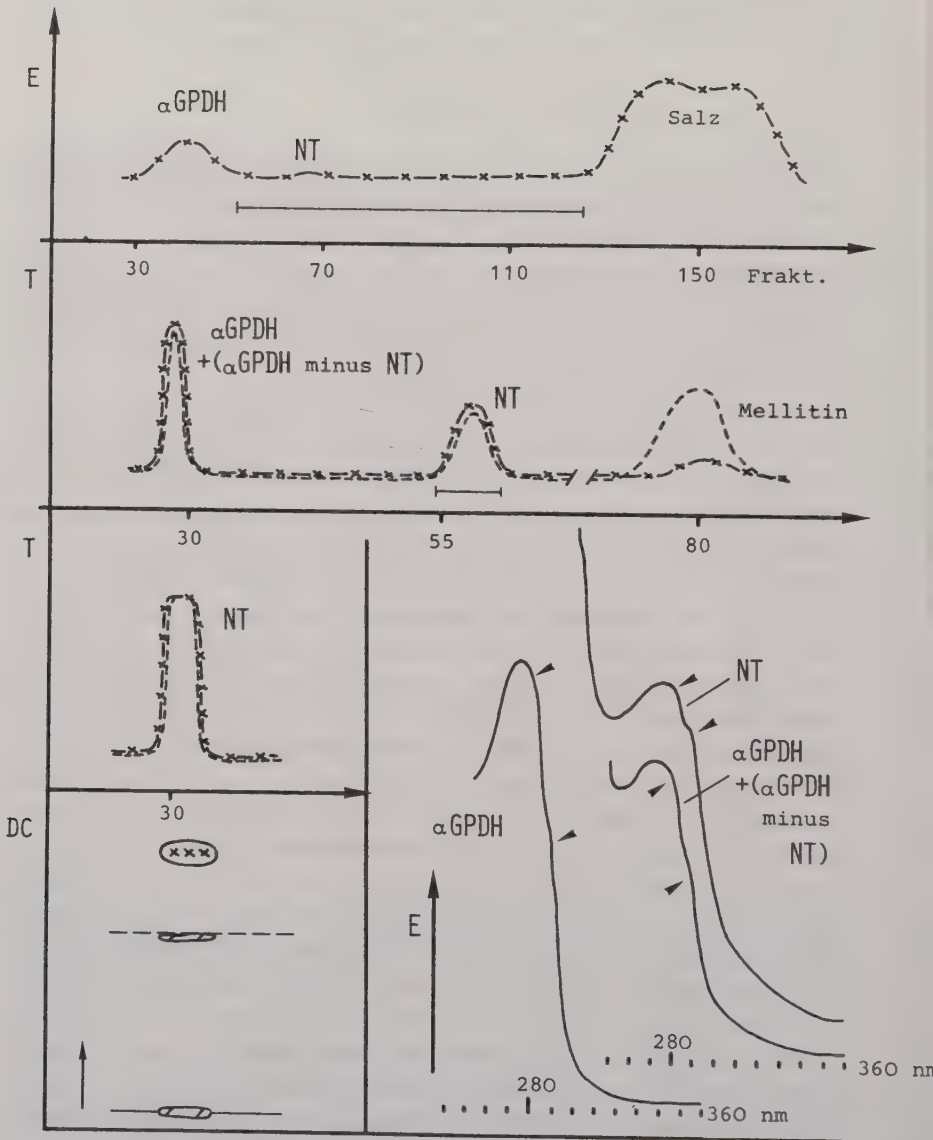
6. Isolierung und Charakterisierung des N-terminalen Fragments NT des acidolytisch gespaltenen N-terminalen Bromcyanpeptids NT-E₁ der α GPDH

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß das N-terminal blockierte und zur Aggregation neigende Bromcyanpeptid prä-A mit dem N-terminal acetylierten Bromcyanpeptid nicht identisch ist, andererseits aber ein noch ausstehendes Fragment von ca. 40 Resten bislang nicht gefunden werden konnte, blieb zu klären, ob das fehlende Stück nicht schon zu einem frühen Zeitpunkt abgespalten worden und verloren gegangen war.

Folgender Befund führte auf die richtige Spur:

Das Transmissionsprofil einer Erstentsalzung der α GPDH zeigte im mittleren Drittel des Fraktionierungsbereichs eine geringe Erhebung (Abbildung 34, Oben). Ihr wurde zunächst keine Beachtung geschenkt, da Basisbewegungen dieser Art häufig Artefakte darstellen, wie sie z.B. am verwendeten Detektor (Uvicord III, LKB) bei Schwankungen der Raumtemperatur beobachtbar sind. Optisch leere Fraktionen aus präparativen Läufen wurden dennoch aus Vorsicht eine Zeitlang aufbewahrt, da das Photometer erfahrungsgemäß sehr geringe Proteinkonzentrationen und Tyr- bzw. Trp-freie Peptide bei 280 nm nicht registrierte. Sämtliche Fraktionen zwischen Protein- und Salzpeak - vereinigt, einrotiert und ein halbes Jahr bei -20°C aufbewahrt - standen deshalb für Nachuntersuchungen zur Verfügung.

Dieser Rückstand wurde nun zur Detektion von Peptiden an einem empfindlichen System rechromatographiert (Abbildung 34, Mitte). Zwei Substanzen ließen sich aus ihm isolieren: die eine wurde mit dem Ausschlußvolumen der Säule eluiert, die andere besaß ein Molekulargewicht von ca. 4000 und fiel durch ihr eigenartiges UV-Absorptionsspektrum auf (Abbildung 34, Re. Unten). Zwar wurde auf Grund der Aminosäurenanalyse (Tabelle 21) in Erwägung gezogen, dieses kleine Peptid könnte in einem Zusammenhang mit dem N-Terminus der α GPDH stehen, doch sprach dagegen, daß sowohl für das große wie für das kleinere Peptid eine End-



gruppe gefunden werden konnte (Pro bzw. Ala und Tyr). Der N-Terminus der α GPDH ist jedoch acetyliert [4]. Das charakteristische UV-Spektrum von NT sprach eher für die Anwesenheit einer unbekannten, chromophoren Gruppe als von Trp, obgleich es dieses auch nicht ausschloß. Nach Literaturangaben besitzt die α GPDH-Untereinheit übereinstimmend 2 Trp [4,169,210]; diese Zahl resultierte aus Berechnungen auf der Basis spektraler Daten der α GPDH [345]. Beide Trp-Reste konnten jedoch zu jener Zeit, als ca. 50% der α GPDH-Sequenzen bekannt waren, bereits bestimmten Bromcyanpeptiden zugeordnet werden (B, D_{1/II}). Es wurde deshalb angenommen, daß sich der C-terminale Abschnitt des ca. 40 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Peptids in den Anfangssequenzen von B oder D_{1/II} fortsetze. In der Zwischenzeit wurde von Mitarbeitern bei der Sequenzierung von NT auf Position 13 ein dritter Trp-Rest

Abbildung 34 Gelchromatogramme und UV-Spektrum des N-terminalen Fragments NT aus der acidolytischen Spaltung des N-terminal acetylierten Bromcyanpeptids NT-E₁ der α GPDH

Oben	Gelchromatogramm einer Entsalzung von kommerzieller α GPDH
	Sephadex G-50 fine 5 x 48 cm 80% Ameisensäure 20-40 ml/h (hydrostatisch)
	Rechromatogramme von NT
Mitte	Sephadex G-75 fine 0,8 x 150 cm 30% Ameisensäure 1,8 ml/h
Unten Li.	Biogel P-2 (-400 mesh) 0,4 x 150 cm 10% Essigsäure 0,54 ml/h
Unten Re.	UV-Spektren von α GPDH (in 80% Ameisensäure), X = α GPDH + (α GPDH minus NT) (in 80% Ameisensäure) und NT (in 10% Essigsäure)
	$\nearrow$ 280 nm $\frac{E_{280\text{nm}}}{E_{289\text{nm}}} = 1,6 \text{ bzw. } 1,6 \text{ bzw. } 1,2$ $\nearrow$ 289 nm

	NT	NT'	α GPDH + (α GPDH minus NT)	α GPDH	α GPDH'
Cys (O ₃ H)	+++ ?	1	+++ ?		
Asx	3,00 3	3	31,27 31	28	28
Met (O ₂)	+		++		
Thr	0,62 1		13,76 14	14	14
Ser	1,98 2	2	15,72 16	12	14
Glx	3,14 3	2	41,63 42	44	42
Pro	0,68 1		15,03 15	15	16
Gly	5,08 5	6	36,76 37	37	40
Ala	4,30 4-	6	31,99 32	32	32
Cys-2				10	10
Val	1,62 2	3	21,32 22	21	27
Ile	1,46 2	3	18,22 19	20	26
Leu	1,92 2	1	28,42 29	29	28
Tyr	0,26		4,00 4	4	4
Phe	1,28 1	1	17,55 18	14	15
Lys	3,05 3	3	25,00 25	25	28
His	0,48 -1		7,87 8	9	9
Arg	0,58 -1		8,04 8	8	8
Trp		?		2	2
N-Term.	Ala	Ac-	Pro	-	-
	Tyr?	Ala			

Tabelle 21 Aminosäurenanalysen der acidolytischen Spaltprodukte NT und α GPDH+ (α GPDH minus NT) (24h-Hydrolysen, unvollständig Perameisensäure-oxidiert)

NT'	zum Vergleich die Aminosäurenzusammensetzung des N-terminalen Spaltpeptids nach erfolgter Sequenzierung
α GPDH	Aminosäurenzusammensetzung der α GPDH-Untereinheit nach eigenen Bestimmungen (24h-Hydrolysen)
α GPDH'	Aminosäurenzusammensetzung der α GPDH-Untereinheit nach Otto u. Mitarb. [169]

Die bei der Endgruppenbestimmung an Fraktionen des vorderen Ausschlußvolumens aufgetretene N-terminale Aminosäure Pro ist auf das Fragment (α GPDH minus NT) zu beziehen. Da ihr Nachweis in einem Bereich erfolgte, in welchem ein negatives Ergebnis (acetylierter N-Terminus) erwartet wurde, mußte der Befund mit einem acidolytischen Ereignis assoziiert werden (Ausbeute ca. 10%). Allerdings hat dieses nicht, wie anfangs vermutet, während der Lagerung der Probe im Eisschrank stattgefunden, sondern sehr wahrscheinlich beim Einrotieren der α GPDH-Fraktionen nach der primären Entsalzung durch akzidentelle Aufheizung des Wasserbades.

nachgewiesen.

Das Ergebnis der Untersuchung zur Säurestabilität der α GPDH (S. 6 ff.) ist durch die Feststellung zu ergänzen, daß auch bei nur kurzzeitiger Inkubation des Proteins in konzentrierter Ameisensäure bei erhöhter Temperatur die Peptidkette gespalten wird. Dieser Befund wurde später bewußt zur präparativen Herstellung des N-terminalen Peptids der α GPDH verwendet [314].

Der Beweis für die Richtigkeit der Verknüpfung NT-E₁ in Form einer überlappenden Sequenz steht noch aus; es gibt aber starke indirekte Hinweise (z.B. Aminosäureanalysen von Überlappungspeptiden), daß diese Peptidfolge korrekt ist.

7. Isolierung, Charakterisierung und Partialsequenzierung analytischer Mengen von Überlappungspeptiden

7.1. Gesicherte Überlappungen

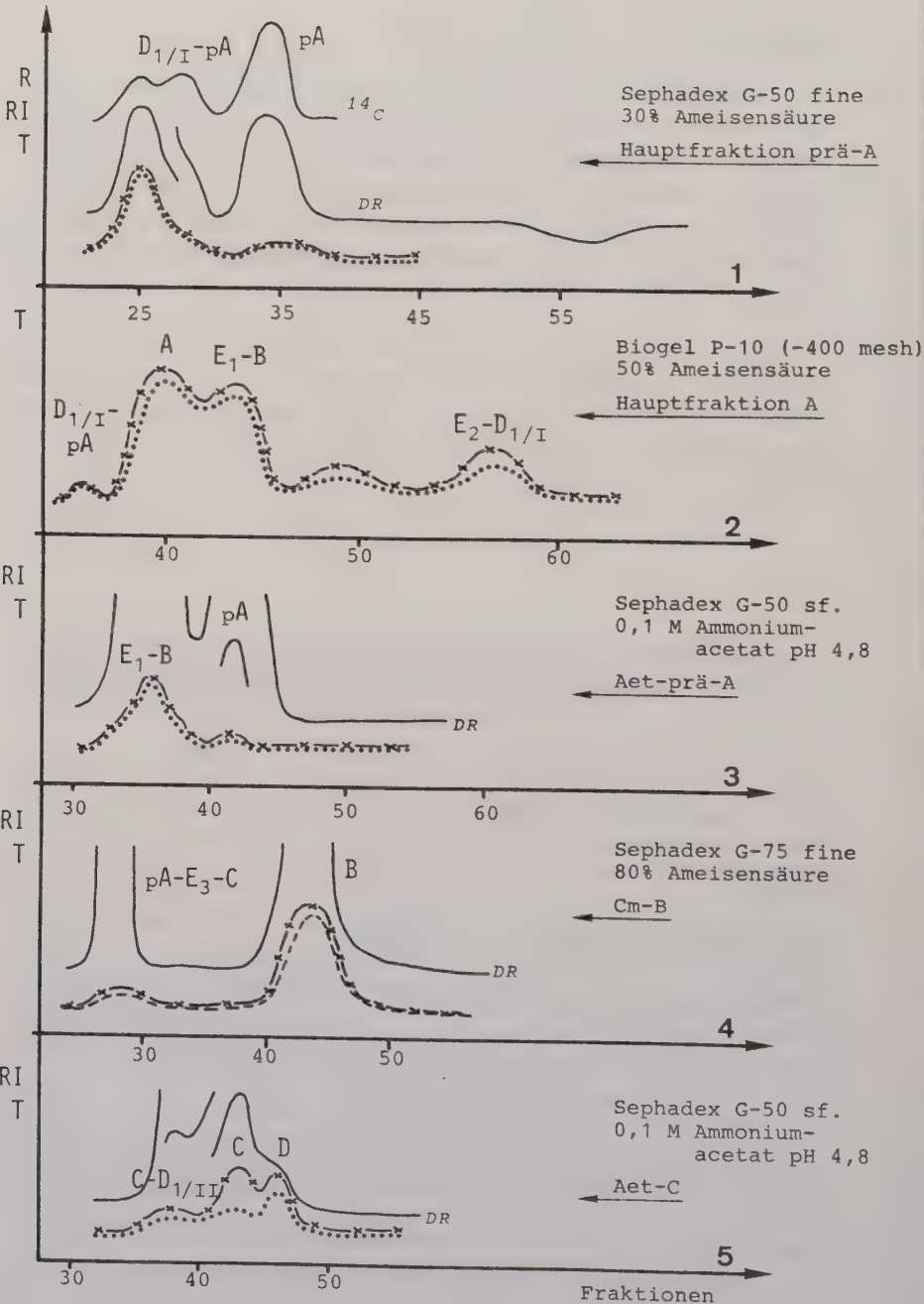
prä-A-E₃

Aus einer Rechromatographie tryptischer Peptide von Cm-prä-A (Abbildung 33, Mitte, Unten) wurde ein Hexapeptid mit dem N-Terminus Leu und der Zusammensetzung (Met(O) +++; Hse +; Glx 0,94; Gly 1,11; Leu 1,81) in reiner Form gewonnen und durch manuellen Edman-Abbau komplett sequenziert:

Leu-Gly-Leu-Met-Glu-Met

E₂-D_{1/1}

Das Peptid wurde bei einer Rechromatographie von Aet-A gefunden (Abbildung 35, 2; Tabelle 22) und ohne weitere Reini-



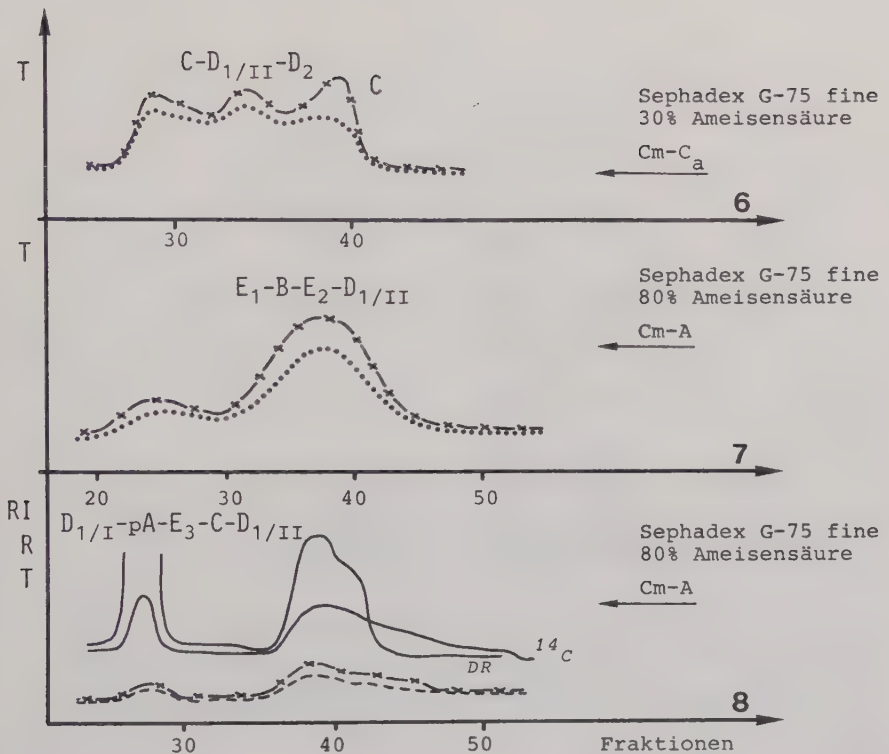


Abbildung 35

Rechromatogramme von Peptidfraktionen der Bromcyan-gespaltenen Aet- bzw. Cm- α GPdH, in denen Überlappungspeptide gefunden wurden

- | | |
|---|---|
| <p>1 Biogel P-30 (-400 mesh)
0,5 x 150 cm
80% Ameisensäure
0,78 ml/h</p> <p>2 Sephadex G-75 fine
0,8 x 150 cm
30% Ameisensäure
1,8 ml/h</p> <p>3 Biogel P-30 (-400 mesh)
0,5 x 150 cm
80% Ameisensäure
0,72 ml/h</p> | <p>4 Sephadex G-75 fine
0,8 x 150 cm
30% Ameisensäure
1,8 ml/h</p> <p>5 Biogel P-30 (-400 mesh)
0,8 x 150 cm
80% Ameisensäure
1,8 ml/h</p> <p>6 Biogel P-30 (-400 mesh)
0,8 x 150 cm
80% Ameisensäure
1,8 ml/h</p> |
|---|---|

	E ₂ -D ₁ /I	E ₁ -B	D ₁ /I-präa		
	24h	24h 96h	24h	72h	120h
Cys (O ₃ H)					
Cys (Cm)			+		
Met (O)	+	++			
Asx	3,33	9,35 8,14	+	8,92	8,37 8,34
Thr	1,19	2,94 2,84	+	5,85	5,19 4,97
Ser	1,54	2,69 2,20		2,27	1,61 2,55
Hse	+	+	+	+	+
Glx	4,89	9,87 8,95		11,23	10,47 10,42
Pro	0,82	4,61 6,70		2,23	1,91 1,95
Gly	3,92	10,13 8,95		10,08	9,44 9,97
Ala	3,72	7,27 7,00		8,54	8,38 8,34
Cys-2				+	0,56 0,61
Val	2,04	6,95 9,66		7,08	7,59 7,69
Met		+		+	+
Ile	1,95	9,45 9,75		5,75	6,13 6,29
Leu	2,93	8,55 8,13		7,20	6,84 6,76
Tyr	0,19	1,13 0,68		1,34	0,52 0,66
Phe	1,28	3,05 3,38		4,61	4,27 4,16
Lys	2,78	9,18 7,79		5,27	5,06 4,92
Cys (Aet)	0,74	1,35			
His	0,41	4,51 2,69			
Hser>	++	+			
Arg	0,32	0,95 1,35		+	+
Gesamt	37			2,38	2,22 2,18
N-Term.	Ser	Pro			
					Gly
					85

Fortsetzung von S. :

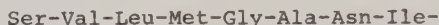
- 7 Sephadex G-100 fine
0,8 x 150 cm
80% Ameisensäure
1,8 ml/h
- 8 Sephadex G-75 fine
0,8 x 150 cm
30% Ameisensäure
1,8 ml/h

Die zur Rechromatographie gegebene Peptidfraktion ist im rechten Teil jeder Kurve über dem nach links weisenden Pfeil angegeben, sowie Matrix und Elutionsmittel der jeweils vorhergehenden Gelfiltration.

	C-D ₁ /II	C-D ₁ /II-D ₂	präA-E ₃ -C		E ₁ -B- -E ₂ -D ₁ /I	D ₁ /I-präA- -E ₃ -C-D ₁ /II	
	24h	72h	24h	72h	72h	24h	
Cys(O ₃ H)		++			++	++	
Cys(Om)		0,35	5	1,40	1,56	1,38	5
Met(O)	+	+		+	+	+	3
Asx	4,71	6,17	5	8,45	7,93	7,61	8
Thr	3,74	4,31	5	7,15	6,49	6,06	8
Ser	2,54	3,98	5	3,69	2,87	2,50	4
Hse	+	++	1	+	+	+	1
Glx	10,66	14,24	16	10,81	11,03	11,02	11
Pro	3,09	4,70	6	2,84	3,03	3,00	3
Gly	6,83	11,43	10	11,67	11,34	11,34	12
Ala	6,34	9,62	9	10,58	10,40	10,44	12
Cys-2		+		+	+	+	
Val	5,49	8,81	7	8,02	8,91	9,32	10
Met	+	0,28	2	0,38	0,53	0,25	2
Ile	4,09	4,25	5	5,77	7,07	7,29	7
Leu	6,57	9,68	11	7,69	8,08	8,14	8
Tyr	1,40	1,56	3	0,84	0,76	0,72	1
Phe	4,94	5,16	7	6,64	6,76	6,66	7
Trp	1	1	1				
Lys	4,09	6,54	7	5,81	5,75	5,68	6
Cys(Aet)	2,59	3					
His	1,25	3,17	4	+	0,44	0,44	
Hse>	+	+		++	++	++	
Arg	3,32	4,49	5	3,91	3,93	3,82	5
Gesamt	88	114					110
N-Term.	Ile	Ile					-
							Pro
							Gly

Tabelle 22 Aminosäureanalysen von Überlappungspeptiden (Abbildung 35)

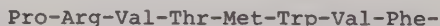
gung nach Homoserinlacton-Kopplung abgebaut:



E₁-B

Dieses Peptid mit dem N-Terminus Pro wurde aus derselben Rechromatographie wie E₂-D_{1/I} erhalten (Abbildung 35, 2; Tabelle 22). Während die meisten Überlappungspeptide nur in Mengen zwischen 6 und 60 nMol gewonnen werden konnten, fielen von diesem Fragment 150 nMol an. Es wurde, in wässriger Lösung suspendiert, mit einem hohen Überschuß an NaBH₄ behandelt (45°C, 2h), mit Ameisensäure eine Konzentration von 80% eingestellt und nach Zugabe eines hohen Überschusses an Bromcyan über 24h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Biogel P-4 (-400 mesh), 0,4 x 150 cm, 20% Ameisensäure, aufgetrennt. Im Ausschlußvolumen bzw. im Fraktionierungsbereich lagen zwei Peptide, die durch DC-, Endgruppen- und Aminosäurenanalyse als B und E₁ identifiziert wurden (die Hydrolyseprodukte von Dns-Trp zeigten auf der Poyamidplatte das charakteristische Fleckenmuster).

Das Überlappungspeptid wurde auch aus einer Rechromatographie von Aet-präA isoliert (Abbildung 35, 3). Im manuellen Abbau wurde folgende Sequenz ermittelt:



7.2. Postulierte Überlappungen

D_{1/I}-präA

Das Peptid wurde aus einer Rechromatographie von Aet-C gewonnen (Abbildung 35, 1) und weiter gereinigt (Tabelle 22). N-Terminus war Gly.

Das isolierte Peptid wurde über 5 Schritte nach Edman manuell abgebaut:



C-D₁/II

Das Peptid wurde aus einer Rechromatographie von Aet-C erhalten (Abbildung 35, **5**; Tabelle 22). Es trat bei verschiedenen Präparationen von Bromcyanpeptiden auf. N-Terminus war Ile.

C-D₁/II-D₂

Das Peptid wurde aus einer Rechromatographie von Cm-C_a (S. 108) isoliert (Abbildung 35, **6**; Tabelle 22) und über 4 Positionen im manuellen Edman-Abbau sequenziert. Die Charakterisierung der C-terminalen Region wurde durch DC-Analyse eines mit Carboxypeptidase A verdauten und anschließend mit Dansylchlorid umgesetzten Peptidaliquots erreicht. Das an viertletzter Position lokalisierte Pro blockierte den weiteren Abbau und war deshalb im Hydrolysat nicht nachweisbar:

Ile-Ala-Phe-Ala-.....(Glu,His)Hse

präA-E₃-C

Das Peptid bildete in einer Rechromatographie von Cm-B in 30% Ameisensäure ein homogenes Aggregat, welches völlig isoliert am vorderen Ausschluß der Säule eluiert wurde (Abbildung 35, **4**; Tabelle 22). Eine N-terminale Aminosäure war nicht nachweisbar. Die Zusammensetzung dieses N-terminal blockierten Fragments spricht unter Berücksichtigung der gesicherten Überlappung präA-E₃ (S. 124) für die obengenannte Reihenfolge der 3 Bromcyanpeptide.

E₁-B-E₂-D₁/I

Das Fragment mit dem N-Terminus Pro war in der Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese einheitlich. Es stellte in einer Rechromatographie von Cm-A die Hauptkomponente (Abbildung 35, **7**; Tabelle 22).

Der erfolgreiche Einsatz der Carboxypeptidase A zur Charakterisierung der Überlappung C-D₁/II-D₂ (s. oben) ermutigte zur Wiederholung: um einen definierten Hydrolysestopp zu errei-

chen, wurden die Lysine des Peptids durch Reaktion mit 1-Guanyl-3,5-dimethylpyrazolnitrat (GDMP) [346] in Homoarginine überführt. Da von der Exopeptidase Arg bekanntlich nur schlecht freisetzt wird, wurde erwartet, daß die Andauung bei Erreichen des guanidinierten Lys an der viertletzten Position des vermutlich mit $D_{1/I}$ endenden Polypeptids zu einem definierten Halt kommt. Nach Dansylierung des Verdauungsansatzes zeigte die DC-Platte tatsächlich die Dns-Derivate von Leu, Hse, Glu und wenig Gln. Unter Berücksichtigung der sequenzierten Überlappung $E_2-D_{1/I}$ (S. 124) und der postulierten Überlappung E_1-B darf die oben angegebene Reihenfolge der 4 Bromcyanpeptide als sehr wahrscheinlich angenommen werden:

Pro-..... (Gln,Leu)Hse

$D_{1/I}$ -präA- E_3 -C- $D_{1/II}$

Dieses Polypeptid, das ebenfalls aus einer Rechromatographie von Cm-A stammt (Abbildung 35, 8; Tabelle 22), besaß als N-terminale Aminosäure Gly und lief in der Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese als einheitliche Bande. Carboxypeptidase A-Andauung eines Aliquots und Umsetzung des Partialhydrolysats mit Dansylchlorid zeigte bei DC-Analyse neben Dns-Leu, -Phe und -Hse interessanterweise auch geringe Mengen an Dns-Pro. Unter Berücksichtigung der sequenzierten Überlappung präA- E_3 (S. 124) und der postulierten Fragmentsequenzen $D_{1/I}$ -präA (S. 129), C- $D_{1/II}$ und präA- E_3 -C (S. 130) wird für 5 Bromcyanpeptide obengenannte Reihenfolge vorgeschlagen:

Gly..... (Pro,Leu,Phe)Hse

Die Abbildung 36 zeigt die von der gesamten Arbeitsgruppe (I. Machleidt, W. Machleidt, J. Otto, E. Wachter, G. Rückl) erarbeitete Totalsequenz der α GPDH aus Kaninchenmuskel. Die in der vorliegenden Arbeit automatisch an der Festphase (►) oder manuell in Lösung (—) ermittelten Aminosäuresequenzen, sowie gesicherte (♦) und sehr wahrscheinliche (●) Überlappungen, sind durch entsprechende Symbole hervorgehoben.

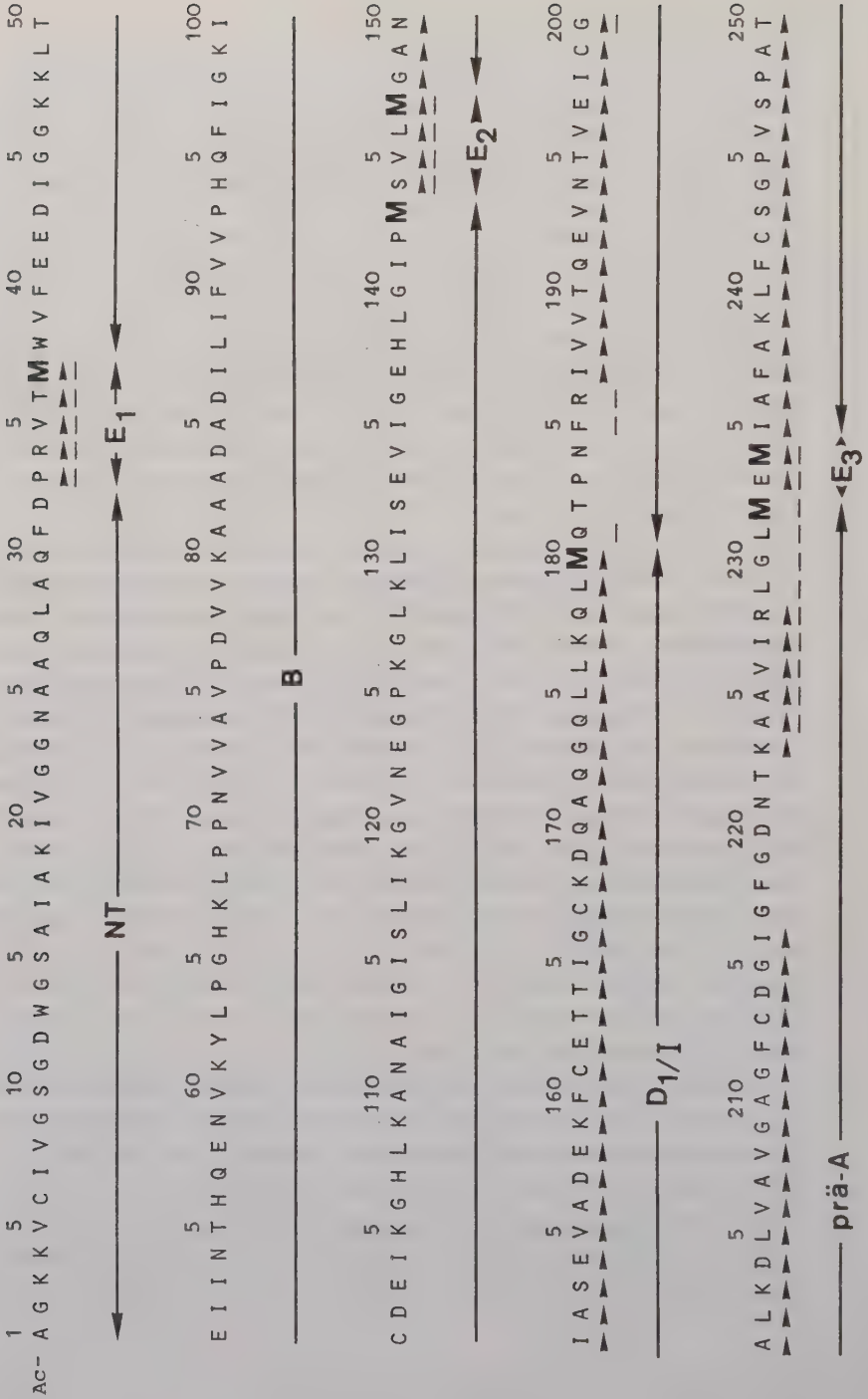
8. Sekundärstruktur der α GPDH

Zum Verständnis des Mechanismus der enzymatischen Katalyse ist eine detaillierte Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Enzymproteins, sowie die Natur und räumliche Position der an der Umsetzung beteiligten Aminosäurenreste eine notwendige Voraussetzung.

Phylogenetische Zusammenhänge können am Verlauf spezifischer Kettenfaltungen (z.B. Nucleotidbindungsfläche, aktive Zentren von Proteasen mit Serin als Protonendonor) auch dann noch aufgezeigt werden, wenn die Ähnlichkeiten zwischen den Aminosäuresequenzen zu gering sind. Da der Verlauf der Kette offenbar besonders gut konserviert wird, deuten Ähnlichkeiten in der Raumstruktur auf gemeinsame Ursprünge in sehr frühen Stadien der Evolution hin.

Die Röntgenstrukturanalyse ist die derzeit einzige Methode, mit deren Hilfe auch sehr komplexe Strukturen bis in die atomare Dimension aufgelöst werden. Bis heute kennen wir die dreidimensionale Gestalt von mehr als 50 Proteinen [355,356]. Kristallographische Analysen sind jedoch sehr mühsam, teuer und viel zeitaufwendiger als die chemische Bestimmung der Aminosäuresequenz (bis heute sind etwa 800 Primärstrukturen bekannt). Die Gewinnung geeigneter Kristalle kann große Schwierigkeiten bereiten; von vielen Membranproteinen, ribosomalen Proteinen und Histonen konnten noch nicht geeignete Kristalle einheitlicher Raumstruktur hergestellt werden. Auch lösliche Enzyme verhalten sich gelegentlich ähnlich. J.I. Harris und Mitarbeiter wandten sich nach vergeblichen Versuchen, eine NAD-freie Eukaryonten-GAPDH in einer zur hochauflösenden Röntgenstrukturanalyse geeigneten Reinheit zur Kristallisation zu bringen, den GAPDH's thermophiler Organismen (*Bacillus thermophilus*, *Thermus aquaticus*) zu [357-359], in der Hoffnung, daß deren höhere Stabilität sie zum Erfolg führe [248,360]. Nicht immer aber lassen sich, wie in diesem Beispiel, durch einen originellen Einfall die Hindernisse überwinden.

Trotz der Kristallisationsfreudigkeit der α GPDH ist es bisher nicht gelungen, Kristalle mit ausreichend einheitlicher Symme-



5 260 5 270 5 280 5 290 5 300
 F L E S C G V A D L I T T C Y G G R N R K V A Q A F A R T G K S I E Q L E K E M L N G Q K L Q G P E

5 310 5 320 5 330 5 340 5 348
 T A R E L H S I L Q H K G L V D W F P L F M A V Y K V C Y E G Q P V G E F I R C L Q N H P E H M

NT - E₁ - B - E₂ - D_{1/I} - präA - E₃ - C - D_{1/II} - D₂

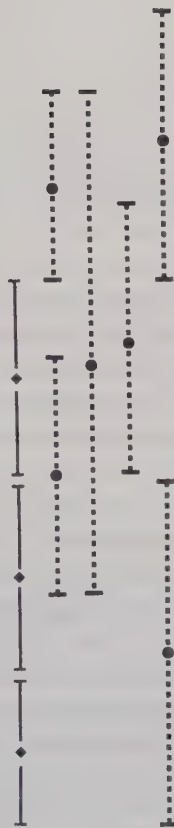


Abbildung 36

Aminosäuresequenz der αGPDH aus dem Skelettmuskel des Kaninchens

- Peptidfragmente aus der Bromcyanspaltung
- ▶ automatisch an der Festphase sequenziert
- manuell in Lösung sequenziert
- Überlappungspeptide
 - ◆ gesichert
 - postuliert

trie zu züchten. Um dennoch, und erst recht nach vollständiger Aufklärung seiner Primärstruktur, strukturelle Information über das Enzym zu erhalten, mußte auf eine andere Methode ausgewichen werden.

Da die native Konformation eines Proteins durch seine Aminosäuresequenz festgelegt ist [361-363], wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe einer der eingeführten Methoden zur Vorhersage der Proteinstruktur [Ref.in 364] einen approximativen Einblick in die Organisation der Kettenfaltung (α -Helices, β -Faltblätter, "ungeordnete" Bereiche) in einer der beiden untereinander identischen Untereinheiten der α GPDH zu gewinnen.

Es wurde der wegen ihrer Einfachheit am häufigsten angewandten "manuellen" Vorhersagemethode nach P.Y. Chou und G.D. Fasman [365-367] der Vorzug gegeben. Sie beruht auf statistischen Rechenverfahren und ist probabilistischer Natur. Ihre Rechengrößen wurden aus der Häufigkeit des Auftretens von α -, β - und ungeordneten Strukturen (Haarnadelbiegungen sind Formelemente letzterer) in 15 [365] bzw. 29 [366,367] Proteinen abgeleitet, von denen kristallographische Aufnahmen hoher Auflösung existierten.

Für eine gegebene Aminosäuresequenz werden durch Kombination dieser Faktoren (propensity factors P_{α} , P_{β} , $P_{C(oil)}$ bzw. $P_{t(urn)}$; P_{t_1} , P_{t_2} etc.) in Hexa- und Pentapeptiden α - und β -Nucleationszentren bestimmt und jede dieser Zonen soweit in beide Richtungen ausgedehnt, bis Reste mit niedrigen α - oder β -Nucleationsfaktoren eine gegebene Sekundärstruktur unterbrechen. Zur Vorhersage von Haarnadelbiegungen (reverse turns = rt) adaptierten die Autoren im wesentlichen das Schema von P.N. Lewis u. Mitarbeitern [367,368]. Die Attraktivität und Beliebtheit der Chou-Fasman-Methode beruht auf ihrem Verzicht auf komplizierte Rechenoperationen* und dem verhältnismäßig geringen Zeitaufwand.

* Verfeinerungen der Analyse sind möglich. Von den Autoren sind Verfahren beschrieben (z.B. Vergleich aller Di- und Tripeptide - 1,2; 2,3; 3,4...bzw. 1,2,3; 2,3,4; 3,4,5... - einer zu analysierenden Aminosäuresequenz mit Di- und Tripeptiden bekannter Konformation) [366]. Bei der Durchführung des erweiterten Programms ist der Einsatz von Computern unerlässlich.

Für die Sekundärstrukturelemente der α GPDH wurden folgende Anteile errechnet:

44%	α -Helix
20%	β -Faltblatt
36%	Haarnadelbiegungen und ungeordnete Bereiche

Auf eine kurze, N-terminale random coil (Reste 1-3) folgt eine β /rt-Region (Reste 4-14) und daran anschließend 5 etwa ebenso lange α /rt-Sequenzen (Reste 15-61); ein längerer rt-coil-Arm (Reste 62-71) steht mit einer $\beta\alpha\beta$ -Struktur (Reste 72-113) in Verbindung, welche in eine Zone mit unregelmäßigen Faltungsmustern übergeht (Reste 114-311). Das C-terminale Ende der Peptidkette fällt durch das Fehlen helikaler Bereiche auf (Reste 312-348) (Abbildungen 37,38).

Die längsten α - und β -Sequenzen enthalten Gly- bzw. Glu-Reste, deren Helix- bzw. Faltblatt-brechende Wirkung von benachbarten Helix- bzw. Faltblatt-Bildnern den Berechnungen nach nicht kompensiert werden kann (Gly_{98,106} in Helix₉₃₋₁₁₃, Gly₂₃₀ in Helix₂₂₄₋₂₄₂; Glu₁₉₂ in Faltblatt₁₈₅₋₁₉₉, Gly₃₁₉ in Faltblatt₃₁₄₋₃₂₈). Sie stellen Schwachpunkte der Sekundärstruktur dar und verleihen den Peptidsträngen erhöhte Mobilität.

Strukturinformation über kristallographisch bekannte Dehydrogenasen wurde zur Erstellung der Vorhersage bewußt nicht mitverwertet, um das ausschließlich rechnerisch gewonnene Ergebnis nicht zu verfälschen.

Die $\beta\alpha\beta$ -Strukturen der Dinucleotidbindenden Domäne konnten auf der Basis der Sekundärstrukturvorhersage allein nicht mit ausreichender Sicherheit lokalisiert werden, wenngleich in der regelmäßigen Folge der geordneten und rt-Bereiche im N-terminalen Drittel der Polypeptidkette das Korrelat zur AMP-Bindungsfläche gesehen werden könnte. Diese Interpretation erhält Unterstützung durch die Existenz einer längeren ungeordneten Faltung zwischen Rest 61 und 71 (Verbindung zwischen Bindungsfläche A₁ und A₂ ??, S. 33), der darauffolgenden $\beta\alpha\beta$ -Sequenz (Reste 72-118) - eine etwas großzügigere Auslegung der Regeln erlaubt eine Insertion von turns in diesem Abschnitt (Abbildung 37-gleichwertige Alternativen) - und der Lokalisation des in


```

α      SSSSSSSSS SSSSSSSSSSS SSSSSSS SSSSSS SSSSSSSSSS
β      VVVVVVVV VVVVV VVV VVVVV VVVVV VVVVV
rt     UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU

```

```

GFCḐGIGGḐNTKAAVIRLGLMĒIAFAKLFCSGPSPATFLĒSCGVDLITTCYGGNRK̄VAGAFARḒTG

pre    SSSSSS_ SSSSSSSSSSSS
        ▲ UUUUUUU VVV VVVUUUUU--VVV UUUUUUUUUU ▲ UU
        SSSSSS

```

```

α      SSSSSSSSSSSS SSSSSSSSSSSSS SSSSSSSSSSSSS SSSSSSS
β      VVVVVVV VVVVV VVVVVVVVV VVVVVVV VVVVVVV
rt     UUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU

```

```

K̄SIEQLĒK̄EMLNGQ̄LQGPĒTARĒL̄HSILQ̄HK̄GLVD̄WFLP̄LMAV̄V̄K̄VCYĒGQ̄PVGĒFIR̄CLQN̄H̄P̄EH̄M

pre    SSSSSSSSSS SSSSSSSSSSS VVVVV VVVVVVVVV VVVVVVV VVVVVVV
        UU ▲ UUUUUUUUUU ▲ UU ▲ VVVVVVVVV VVVVVVVVV VVVVVVV VVVVVVV
        SS ▲ SS

```

Abbildung 37 Sekundärstruktur der αGPDH
 vorhergesagt nach der Methode von CHOU u. FASMAN [365-367]

α	α-Helix	[SSS]	random coil-Reste	----
β	Regionen mit Potential für	β-Faltblatt [VVV]	N- und C-terminale	SSS VVV
rt		Haarnadelbiegung(en) (reverse turns)	Grenzen der Haarnadelbiegung(en)	▲ UU ▲
pre	Vorhersage (mit Angabe gleichwertiger Alternativen)	[UUU]		

NAD-bindenden Dehydrogenasen streng konservierten Gly-Triplets (Gly_{7,9,12} in GAPDH, Gly_{28,30,33} in LDH, Gly_{199,201,204} in LADH etc.) an Position 9, 11 und 14 der α GPDH. Die Häufung von Helices am N-terminalen Ende der Kette schließt das Vorliegen von Faltblättern in der tatsächlichen Struktur keineswegs aus: jede der Helices besitzt ein beträchtliches β -Potential und die Festlegung auf Helices ergab sich lediglich aus dem Größenvergleich der konkurrierenden Potentiale.

Zusammenfassend wird für die Dinucleotidbindende Domäne der α GPDH folgende Lokalisation vorgeschlagen:

	GAPDH	Korrelat in der α GPDH	
β_A	1- 7	4- 8	
turn			
α_B	8- 25	9- 24	
turn			
β_B	26- 32	25- 34	A_1
turn			
α_C	33- 68	35- 46	
turn			
β_C	69- 75	47- 53	
turn			
linker α_D	76- 89	54- 71	
turn			
β_D	90- 95	72- 75	
turn			
α_E	96-113	76- 86	
turn			
β_E	114-120	87- 92	A_2
turn			
α_F	121-140	93-114	
turn			
β_F	141-147	115-118	

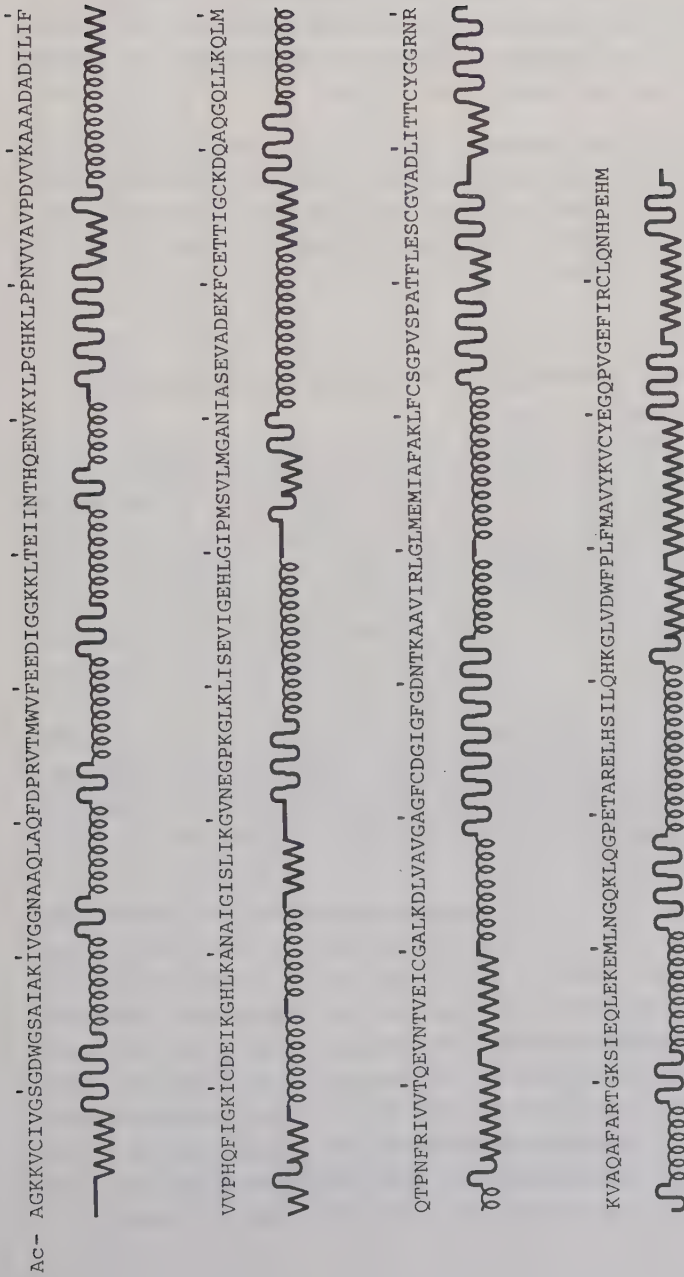


Abbildung 38

Sekundärstruktur der αGPDH (Vorhersage nach CHOU-FASMAN)

α
β
rt

Die Lokalisation der katalytischen Domäne ergibt sich aus der Projektion der NAD-bindenden Domäne in das N-terminale Drittel der Peptidkette: sie dürfte sich aus der C-terminalen Hälfte des Proteins konstituieren.

Eine Korrelation der Aminosäuresequenz der α GPDH mit jenen bekannter Dehydrogenasen ist schwierig. Homologe Sequenzabschnitte können erst nach Durchführung einer MBCC (minimum base change per codon)-Analyse [296] mit ausreichender Sicherheit angegeben werden.

Hinsichtlich der praktischen Ausführung der Vorhersage sind folgende Anmerkungen zu machen:

Obwohl von den Autoren gegenüber Kritikern [369] heftig verteidigt [366], geben die Regeln von Chou und Fasman in der Tat auf viele relativ häufig auftretende Grenzfälle (z.B. α - β -Überlappungen, Grenzziehung zwischen benachbarten α - β -Bereichen, Signifikanz von Haarnadelkurven-Potentialen in Bereichen mit hohen α - oder β -Potentialen) keine ausreichende und ohne komplizierte gedankliche Kombinationen nachzuvollziehende Entscheidungshilfen.

Der große Spielraum für "gefühlsmäßige" Entscheidungen dürfte sich deshalb im Gesamtergebnis niederschlagen, sehr zuungunsten derjenigen, die in der Anwendung der Methode nicht geübt sind bzw. keine Gelegenheit hatten, ihre Trefferquote an bekannten Strukturen zu testen.

Neben den wenig präzise formulierten Regeln fallen dem aufmerksamen Anwender einige Inkonsistenzen auf. Dazu ein Beispiel: Eine der Regeln lautet: '...Pro cannot occur in the inner helix or at the C-terminal helical end but can occupy the first turn (i.e. third residues) in the N-terminal helix' [366]. Abgesehen von der wenig klaren Ausdrucksweise ('the first three residues' anstelle von 'third residues' ??) führten die Autoren im Falle von Pro am N-terminalen Ende einer Helix ($P_{\alpha N} = 2,01$!!) keinen Korrekturfaktor für den P_{α} -Wert von Pro ($= 0,57$) in diesem speziellen Fall ein, was bei der Aufwertung

von B_α zu I_α sinnvoll erscheint. In Situationen, in denen praktisch äquivalente α - und β -Potentiale vorliegen, sog. "Pattstellung", könnte ein angehobener P_α -Wert für N-terminales Pro ein tatsächlich vorhandenes Übergewicht des Helixpotentials schaffen.

Trefferunsicherheiten der Methode zeigten sich bei der Anwendung der Regeln auf Tetrapeptide, die auf Grund ihrer Atomkoordinaten eindeutig als β -turn-Bildner identifiziert und zur Berechnung der P_t -Faktoren herangezogen wurden [367]. Bei etlichen von ihnen, wahllos herausgegriffen, lag das α - und β -Potential höher als das rt -Potential, d.h. bei unbekannter Sekundärstruktur wären einige Haarnadelbiegungen übersehen worden.

Die Genauigkeit der Vorhersage leidet nicht nur unter der Unschärfe der Regeln, vor allem, wenn sie von Ungeübten angewendet werden, sondern auch unter sog. kleinen Sequenzierungsfehlern. Da manche Gln-Reste bei der Isolierung von Fragmenten einer Desamidierung unterliegen, verdient der Hinweis Erwähnung, daß ein Glu $\leftrightarrow$ Gln-Austausch vor allem das α/β -Potential eines Sequenzabschnittes entscheidend beeinflussen kann. Bei einem Glu $\leftrightarrow$ Gln-Austausch in den Bereichen Val₃₅-Glu₄₂ (Glu₄₁ oder 42) und Lys₄₇-Ile₅₃ (Glu₅₁) der α GPDH z.B. müßten die vorhergesagten α -Helices durch β -Sequenzen ersetzt werden: während Glu ein starker Helixbildner und Faltblattbrecher ist, wirkt Gln als schwacher Helix- und Faltblattbildner (Glu: H_α , B_β ; Gln: h_α , h_β). Beim Paar Asn/Asp sind die durch einen Wechsel bedingten Potentialänderungen nicht ganz so extrem, auf keinen Fall aber vernachlässigbar (Asp: I_α , B_β ; Asn: b_α , i_β) [366].

Trotz der erwähnten Einschränkungen ergab die Anwendung der Chou-Fasman-Methode auf zwei Aminosäuresequenzen (Adenylatkinase [370]; ribosomales Protein S8 [371]) eine erstaunlich gute Übereinstimmung der vorhergesagten Sekundärstruktur mit der kristallographisch ermittelten Sekundärstruktur [372] bzw. kollektiven Vorhersagen [371,372].

Ermutigend ist die gegenüber den Originalwerten [365] deut-

lich erhöhte Trefferquote bei Benützung der überarbeiteten Nucleationsfaktoren [366].

C.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Material

1.1. α GPDH-Präparat

α GPDH aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens wurde von Boehringer, Mannheim, als Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfat, pH ca. 6, bezogen. Fremdaktivitäten an Aldolase (EC 4.1.2.13.), Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (EC 1.2.1.12.), Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27.) und Triosephosphatisomerase (EC 5.3.1.1.) überschreiten laut Hersteller nicht 0,01% der spezifischen Aktivität.

Das Präparat besaß von Charge zu Charge eine gleichbleibende Aminosäurezusammensetzung und wurde ohne weitere Reinigung zur Sequenzermittlung eingesetzt.

Die Mehrzahl der Untersuchungen wurden an folgenden Chargen durchgeführt:

Charge A	Kt.Nr.	7382319	10.1973
Charge B		7153321	1.05.1974
Charge C		7204224	1.06.1975

1.2. Chemikalien

Chemikalien, die in der folgenden Zusammenstellung nicht erscheinen, wurden in der Regel in p.A.-Qualität von Merck, Darmstadt, bezogen. Alle übrigen stammten von:

Serva, Heidelberg:

SDS (Dodecylsulfat-Na-salz, krist.reinst)

Acrylamid, 2×krist, p.A.

N,N'-Methylenbisacrylamid, krist.reinst

Ammoniumpersulfat, p.A.

TMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, reinst)

o-Tolidin, p.A.

DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), reinst)
Guanidine hydrochlorid, p.A.
EDTA (Ethylen-diamin-tetraessigsäure-Na₂-salz, p.A.)
Bromcyan, reinst
Dansylchlorid (5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid, p.A.)
Trimethylchlorsilan, reinst
DTE (Dithioerythrit, reinst)
Harnstoff, p.A.
Fluram (Fluorescamin, p.A.)
PTH-Chrom S

Albumin (Rinderserum)	Albumin (Hühnerei)
Catalase (Rinderleber)	Thermolysin (Bac. thermo- proteolyticus)
Aldolase (Kaninchenmuskel)	Cytochrom c (Pferdeherz)
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	Myoglobin (Pferdemuskel)
Chymotrypsinogen A (Rinderpankreas)	Mellitin (Honigbiene)
γ-Globulin (Menschenserum)	

Fluka, Buchs:

TEA (Triethylamin, puriss.p.A.)
DMF (N,N-Dimethylformamid, für UV-Spekt.); (für chem. Umsetzungen)
EDC (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid, puriss.biochim.)
HOBT (1-Hydroxybenzotriazol, purum)
dBdC (Di-tert.-butyldicarbonat, purum)
GDMP (3,5-Dimethylpyrazolyl-formamidiniumnitrat, purum)
PITC (Phenylisothiocyanat, puriss.p.A.)
Aziridin, z.S., mit KOH stabil.

Andere:

<u>NAD(H)</u> (β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid) (reduziert)·Na ₂ -salz, krist.	Boehringer, Mannheim
<u>Pronase P</u> (Streptomyces griseus)	
<u>Leucin-Aminopeptidase M</u> (Schweinenieren)	
<u>Carboxypeptidase A</u> (Rinderpankreas)	
<u>CTA</u> (Citraconsäureanhydrid)	Eastman Kodak, Rochester, N.Y.
<u>DITC</u> (p-Phenyl-diisothiocyanat)	
<u>SPITC</u> (4-Sulfophenylisothiocyanat, sequenl grade)	Pierce, Rockford, Ill.
<u>CPG-10-75 Å</u> (Controlled-pore glass, 200-400 mesh)	Electro-Nucleonics, Fairfield, N.J.
<u>[2-¹⁴C]Jodessigsäure</u> , 50 μCi/μMol	Amersham Buchler, Amersham, England
<u>DABITC</u> (4-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat)	Gabe von Dr. J.Y. Chang, Berlin
<u>DNA-abh. RNA-Polymerase</u> (E.coli)	Gabe von Dr. P. Palm, Martinsried

Folgende Reagentien wurden destilliert:

Pyridin, z.S.	über Ninhydrin
TEA	über Ninhydrin

TFA (Trifluoressigsäure) über CrO_3 am Rückfluß, anschließend mit 96% H_2SO_4 überdestilliert, zur Hydrolyse von Anhydrid 1 Tropfen Wasser/Liter gegeben

Das im Festphasensequenator aufstehende Methanol p.A. hatte einen Wassergehalt von max. 0,01%.

Polyacrylamid-Gele (Biogel^R) stammten von BioRad Laboratories, Richmond, Ca., Dextran-Gele (Sephadex^R) von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

Die BioRad-Präparate wurden in der Regel vor Gebrauch unter dem Lichtmikroskop auf den Anteil sehr kleiner (fines) und nichtsphärischer Partikel hin untersucht. Zur Chromatographie fand, nach beträchtlichen Schwierigkeiten mit heterogenen Batches, in der Folge nur einwandfreies Material Verwendung, das den Spezifikationen des Herstellers tatsächlich genügte.

"Fines" führen, besonders in konzentrierten organischen Säuren, zu ungünstigem Gerverhalten und verursachen häufig eine Verstopfung der Säulenfritten. In Fällen, in denen ausreichende Gelqualitäten nicht erhältlich waren, wurde durch mehrmaliges Aufschlännen der Gelsuspension und Absaugen der Fines eine einheitlichere Gelfraktion hergestellt, mit der befriedigende Trennungen möglich waren.

DC-Platten:

Analytische DC	DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenz- indikator) d=0,25 mm	Merck, Darmstadt
DC von Dns-, Pth- u. Dabth-Aminosäuren	DC-Fertigfolien, F 1700 Mikropolyamid	Schleicher u. Schüll, Dassel
Streifen zur Acetylcellulose- Harnstoff-Elektro- phorese	Cellogel ^R	Chemetron, Milano

2. Methoden

2.1. Analytische Methoden

2.1.1. Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese [302-304]

Die Gradientengele (5-25% Acrylamid) wurden in Eigenbau-Elektrophorese-Apparaturen (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) nach Vorschrift im Kühlraum bei 0-4°C und einer Leistung von 10 W/Gel (z.B. 250 V, 40 mA) über einige Stunden gefahren und die Proteinbanden mit Coomassie Brillant Blau angefärbt.

2.1.2. Acetylcellulose-Harnstoff-Elektrophorese [304,305]

Die Cellogel-Streifen (4 x 17 cm) wurden 30 min im Elektrophoresepuffer äquilibriert, anschließend auf der gekühlten Platte (5°C) der Flachbett-Elektrophorese-Apparatur ausgebreitet und an den Auftragsstellen mit einer schmalen, 3 cm breiten Rinne versehen. In diese wurden mittels einer Polyethylenkapillare 5-7, μ l (30-50 μ g Protein) der in einer wässrigen Mischung aus 6 M Harnstoff und 10-20% Dimethylformamid (DMF) gelösten Probe appliziert. Durch Aufpressen von Filtrierpapierstreifen beiderseits der Rinne ließ sich die Absorption der Probe beschleunigen. Nach Beendigung der Elektrophorese, in der bis zu 3 Streifen gleichzeitig gefahren werden können, wurden die Proteinbanden mit Amidoschwarz angefärbt.

Jede α GPDH-Charge (A,B,C) wurde in 4 verschiedenen Puffersystemen (1 - 4) über 3 verschiedene Laufzeiten (90,180,360 min) analysiert.

Färbelösung:

Amidoschwarz 10 B	5 g
Methanol	450 ml
Essigsäure	100 ml
Wasser	450 ml

Entfärbelösung:	Methanol	475 ml
	Essigsäure	50 ml
	Wasser	475 ml

- 1) ca. 0,9 M Milchsäure (90%) 74 ml 1000 V
6 M Harnstoff 360 g 20 mA/
0,01 M Titriplex III 4 g Streifen
0,02 M 2-Mercaptoethanol 1,5 ml
13 % DMF 130 ml
0,18 M Tris 22 g
mit ca. 9 ml 37% HCl bei 5°C auf pH 3,6 gestellt

- 2) ca. 0,3 M Maleinsäure (z.S.) 35 g 1000 V
HTM wie 1) 24 mA/
20 % DMF 200 ml Streifen
mit ca. 12,5 ml Ethanolamin bei 5°C auf pH 5,8 gestellt

- 3) ca. 0,3 M Phosphorsäure (85%) 20 ml 1000 V
HTM wie 1) 14 mA/
20 % DMF 200 ml Streifen
mit ca. 13 ml Ethanolamin bei 5°C auf pH 7,4 gestellt

- 4) ca. 0,5 M Borsäure 31 g 1000 V
HTM wie 1) 11 mA/
13 % DMF 130 ml Streifen
mit ca. 8 ml Ethanolamin bei 5°C auf pH 9,8 gestellt

Endvolumina der Lösungen: 1000 ml

2.1.3. Acetylcellulose-Elektrophorese

Sie wurde in einer Mikrophor^R-Kammer (Boskamp, Herxell) nach Aufstempelung der Proben auf entsprechende, in 0,05 M Pyridinium-acetat pH 6,5 äquilibrierte Folien bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Laufzeit von 15-60 min (100-250 V) wurden die Peptide mit Coomassie Brillant Blau angefärbt (0,1%; Lösungen wie unter 2.1.1.).

Wegen der schlechten Anfärbbarkeit kürzerer Peptide wurde eine gegenüber Proteinen 5-fach höhere Menge an Peptid eingesetzt.

2.1.4. Analytische Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel

Zur DC-Analyse von Säuleneluat wurden pro Fraktion (in der Regel 30 min-Fractionen) 5-50 μ l Lösung entnommen und in einem Abstand von 0,5 cm voneinander und 2 cm von der Unterkante entfernt auf eine Kieselgel-Platte (20 x 20 cm) aufgetragen. Diese wurde ohne vorhergehende Äquilibration im Fließmittel

Chloroform / 25% Ammoniak / Methanol = 2 / 1 / 2 (v/v/v) entwickelt (Dauer ca. 3h).

Peptide und Aminosäuren wurden in der fluorogenen Reaktion zwischen primären Aminogruppen und Fluorescamin nachgewiesen [307-309]: zur Entfernung interferierenden Ammoniaks wurden die Platten in einem Trockenofen mind. 30 min lang einer Temperatur von 100°C ausgesetzt. Nach Abkühlung wurden sie mit Fluorescamin-Lösung (8 mg Floram^R/250 ml Aceton) bepinselt und nach ca. 20 min unter UV-Licht (350 nm) betrachtet.

Substanzen, die dem Nachweis mit Fluorescamin entgingen (z.B. N-terminal blockierte und mit Pro beginnende Peptide), wurden mit dem Chlor/o-Tolidin-Reagens [311] sichtbar gemacht: dazu wurden die Platten in Chromatographiekammern 5 min einer Chlorgas-Atmosphäre ausgesetzt (erzeugt durch Einwirkung weniger Tropfen rauchender HCl auf KMnO₄-Kristalle), überschüssiges Chlor durch 1h-Überblasen mit Preßluft im Abzug entfernt und die chlorierten Aminosäuren und Peptide durch Besprühen mit der o-Tolidin-Lösung (s.u.) angefärbt. An Stellen niedriger Substanzkonzentrationen entwickelte sich eine dunkelviolette bis anthrazitene, an Stellen hoher Substanzkonzentrationen eine orange bis rote Farbe. Wie bei der Fluorescamin-Anfärbung wurden auch diese Flecken dokumentiert, da sich die Intensität der Färbung innerhalb weniger Stunden stark abschwächte.

Die Nachweisgrenzen für Peptide von 7-10 Aminosäurenreste aufwärts liegen bei der Chlor/o-Tolidin-Methode niedriger als bei Anfärbung mit Fluorescamin. So lassen sich z.B. noch 100 pMol eines Hekapeptids ohne Schwierigkeit nachweisen.

Die Peptidanalyse mit dem Chlor/o-Tolidin-Reagens wurde routinemäßig im Anschluß an die Anfärbung mit Fluorescamin durchgeführt.

o-Tolidin-Lösung: 3 g o-Tolidin werden in einer heißen Mischung aus 20 ml Essigsäure und 980 ml Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen werden ungelöste Bestandteile abfiltriert und die klare Lösung mit 1000 ml 0,05 N KJ-Lösung verdünnt.

2.1.5. Aminosäurenanalyse

a) nicht-trägergebundene Peptide

Die Glasröhrchen mit den Proben und je 200 μ l 5,7 N HCl (3 x destilliert) wurden an der Ölpumpe evakuiert und über der Flamme abgeschmolzen. Die Dauer der bei 110°C durchgeführten Hydrolyse betrug im Normalfall 24h; bei längeren Peptiden und/oder dem Vorliegen hydrolyseresistenter Bindungen wurden Kinetiken erstellt (24, 60, 96, 120h). Zum Schutz von Tyr wurde den Proben in einzelnen Fällen ein Aliquot Phenol (ca. 100-500 nMol) beigegeben. Die Hydrolysate wurden über NaOH-Plättchen im Exsikkator eingetrocknet und zur Analyse in den Eigenbau-Aminosäurenanalysatoren (2-Säulen-System zur getrennten Bestimmung der basischen bzw. sauren und neutralen Aminosäuren) [347] oder am Durrum D-500 (Durrum, Palo Alto, Ca.) im Applikationspuffer gelöst.

b) trägergebundene Peptide

Die Prozedur verlief im wesentlichen wie unter a) beschrieben.

Zur quantitativen Gewinnung des Hydrolysats wurde das Glasröhrchen nach dem Öffnen zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Sediment (Glaspartikel) 2 x mit je 100 μ l Wasser nachgewaschen. Überstand und Waschlösungen wurden vereinigt und eingetrocknet.

2.1.6. Analytische Gelchromatographie

siehe 2.2.6. (Präparative Gelchromatographie)

2.1.7. Bestimmung der Cysteine mit DTNB [317]

In der Meßküvette wurde 1 ml Umsetzungspuffer

0,5 M Tris/HCl pH 7,0
6 M Guanidiniumchlorid
0,02 M EDTA-Na₂

vorgelegt. Nach Zugabe von 5-10 nMol α GPDH-Monomer - auf vollständige Lösung ist sorgfältig zu achten - und eines 10-20 fachen Überschusses an DTNB, im Puffer gelöst, über die theoretisch zu erwartende Zahl an SH-Gruppen wurde die Bildung von 2-Nitro-3-Thiobenzoat durch Absorptionsmessung bei 412 nm gegen Puffer als Referenzlösung verfolgt. Der bei Raumtemperatur in 20-30 min erreichte maximale Extinktionswert wurde zur Berechnung der Protein-SH-Gruppen verwendet ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

War die α GPDH vorher in konz. Ameisensäure gelöst (z.B. nach der Erstentsalzung), wurde ein Aliquot in der Küvette eingetrocknet und mit 1 ml Umsetzungspuffer gelöst. Dieses Vorgehen verhindert einen Abfall der pH ins Saure und erspart umständliches Nachtitrieren.

2.1.8. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren mit der Dansyltechnik [306]

0,5-1 nMol Peptid wurden in einem Glasröhrchen ($0,3 \times 5 \text{ cm}$) zur Trockne gebracht. Saure Äquivalente aus Lösungsmittelresten wurden durch wiederholtes Zugabe und Eintrocknen von aliquoten Mengen an 0,2 M NaHCO₃ neutralisiert. Dann wurden 10 μ l frisch angesetzter Dansylchlorid-Lösung (5 μ l einer Stammlösung von 2,5 mg/ml Aceton mit 5 μ l Wasser verdünnt) zum Rückstand pipettiert, das Röhrchen nach kräftigem Rütteln mit Parafilm verschlossen und 30 min lang bei 45°C gehalten. Anschließend wurde die Probe eingetrocknet und in 50 μ l 5,7 N HCl nach Abschmelzen des Röhrchens 8 h bei 110°C hydrolysiert. Nach erneutem Eintrocknen wurde der Rückstand zur Identifizierung der Dns-Aminosäuren in 5-10 μ l 80% Ethanol gelöst und die N-terminalen Aminosäuren nach bekannter

Methode unter Verwendung eines Referenzgemisches auf beidseitig beschichteten Polyamidplatten (5 × 5 cm) identifiziert.

Zusammensetzung der Fließmittel zur 2-dim. DC:

System I	1,5% Ameisensäure
System II	Benzol/Essigsäure = 10/1 (v/v)
System III	Essigsäureethylester/Methanol/Essigsäure = 20/1/1 (v/v/v)
System IV	1,5% wässr. Ammoniak (erlaubt, in der Laufrichtung von System I angewendet, die Unterscheidung zwischen ϵ - NH ₂ -Dns-Lys, Dns-Arg und Dns-His)

2.1.9. Bestimmung der Aminosäuresequenz durch automatisierten Edman-Abbau von Peptiden an der Festphase [323-325, 348-350]

2.1.9.1. Kopplung der Peptide an die Festphase

2.1.9.1.1. Homoserinlacton-Kopplung [321]

20-800 nMol Bromcyanpeptid, frei von primäre oder sekundäre Aminogruppen enthaltenden Puffersubstanzresten, wurden in einem 1,5 ml-Polypropylen (PP)-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) in 1 ml wasserfreier TFA 30 min bei 45°C inkubiert und anschließend in einem frisch beschickten Exsikkator über NaOH-Plättchen sorgfältig getrocknet.

Dann wurde das lactonisierte Peptid in 500 µl DMF gelöst, mit 200 mg APG* vermennt, 10 µl TEA als Protonenakzeptor hinzugegeben und das Gefäß dicht verschlossen (wegen der begrenzten Löslichkeit des Peptids in DMF in Gegenwart von Spuren Wassers empfiehlt es sich, in dieser Phase zügig zu arbeiten). Obwohl

* Die Herstellung der derivatisierten Gläser ist in der angegebenen Literatur (s. Ergebnisse) beschrieben.

einige Kopplungsreaktionen innerhalb von Minuten vollständig abgelaufen waren, wurden die Proben in der Regel einige Stunden oder über Nacht am Rüttler bei langsamer Frequenz geschüttelt. Schließlich wurde das Glas auf der Fritte (D1, Mikro-Filternutsche 2 ml, Schott, Mainz) mit 3 x 2 Vol. TFA (Desorption nicht-kovalent gebundener Substanz) und Methanol ohne Absaugen gewaschen und nach Abdecken der Fritte mit einem Silicondeckel an der Wasserstrahlpumpe getrocknet.

2.1.9.1.2. DITC-Kopplung [337]

50-400 nMol des Lys-enthaltenden Peptids wurden in einem 1,5 ml-PP-Reaktionsgefäß in 1 ml wasserfreier TFA 30 min bei 45°C inkubiert, im Exsikkator über NaOH-Plättchen getrocknet und in 500 µl DMF gelöst (zügig arbeiten!). Dann wurden 190 mg DITC-APG zugegeben, gefolgt von 10 µl TEA zur Freisetzung von primären bzw. sekundären Aminogruppen aus ihren NH_4^+ -Salzen, und das Kopplungsgemisch über Nacht bei langsamer Rüttlerfrequenz geschüttelt. Der peptidbeladene Träger wurde auf der Fritte gewaschen (s. 2.1.9.1.1.), wobei dem Methanol zur Vermeidung einer vorzeitigen Abspaltung der N-terminalen Aminosäure eine Spur TEA zugegeben wurde.

2.1.9.1.3. C-terminale Kopplung [351]

50-300 nMol Peptid wurden in TFA inkubiert, getrocknet, in DMF gelöst (Volumina u. Bedingungen s. 2.1.9.1.1.), und mit 1-2 mg HOBT bzw. EDC aktiviert [336,352]. Nach Zugabe von 190 mg APG wurde das Kopplungsgemisch über Nacht bei langsamer Frequenz geschüttelt und anschließend auf der Fritte gewaschen (s. 2.1.9.1.1.).

2.1.9.2. Sequentieller Abbau am Festphasen-Sequenator [349]

Technische Details der Apparatur, sowie aufstehende Reagentien

und Programmablauf von der Füllung der Trägersäule bis zur Sammlung der in der TFA-Phase eluierten Ptz-Aminosäuren sind in der angegebenen Literatur beschrieben und wurden während des Zeitraums der Entstehung dieser Arbeit nicht wesentlich abgeändert.

2.1.9.3. Identifizierung der Pth-Aminosäuren

Vor Identifizierung wurden die Ptz-Aminosäurenderivate in die Pth-Isomere konvertiert: die TFA der Spaltungsphase, in der die Ptz-Derivate gelöst sind, wurde im Exsikkator verdampft, der Rückstand in 50 μ l 1 N wässr. HCl gelöst und 10 min bei 80°C inkubiert. Nach erneutem Eintrocknen der Lösung wurden die Pth-Derivate in einem entsprechenden Volumen Methanol zur Identifizierung gelöst.

2.1.9.3.1. Gaschromatographische Identifizierung

Die Chromatogramme wurden an einem Gerät mit schwefelspezifischem, flammenphotometrischem Detektor gefahren (Shimadzu CG-6A, FPD, Tokio). Die flüssige Phase der Säule setzte sich aus 0,75% SE 30 und 4,25% QF 1 zusammen, Träger war Chromosorb W/AW HMDS. Der Pth-Menge entsprechende Aliquots wurden in je einem isothermen Lauf bei 200-220°C und 240-250°C analysiert. Bei der niedrigeren Temperatur wurden die Pth-Derivate von Cys(Cm), Cys(Aet), Ser, Ala, Gly, Val, Thr, Pro, Ile, Leu, und - als interne Standards - α -Aminobuttersäure, Nle und α -Aminoheptansäure nachgewiesen. Bei der höheren Temperatur wurden die Pth-Derivate von AspOCH₃, GluOCH₃, Met, Phe und Tyr bestimmt. Auf einen GC-Nachweis von Gln, Asn und Trp nach Silylierung wurde verzichtet, da durch Dekomposition dieser Derivate sehr rasch das Quarzfenster der Flamme verschmutzt wird, was einen beträchtlichen Empfindlichkeitsverlust zur Folge hat. Der Vorteil der GC-Identifizierung mit einem schwefelspezifischen, flammenphotometrischen Detektor liegt zum einen in der extrem hohen Empfindlichkeit: die Nachweisgrenzen liegen bei etwa 5 (!) pMol Pth-Derivat, zum anderen in der Selektivität

für ausschließlich aus der Reaktion mit dem PITC stammenden, schwefelhaltigen Verbindungen. Alle übrigen Reaktionsprodukte und Verunreinigungen, wie sie der Flammenionisationsdetektor erfaßt und dadurch die Elutionsprofile kompliziert, werden unterdrückt.

2.1.9.3.2. Massenspektrometrische Identifizierung

Das Massenspektrometer gestattet die quantitative Identifizierung aller Aminosäuren-Pth's mit Ausnahme von Arg-Pth bis herab zu ca. 50 pMol. Die Guanidiniumgruppe kann nicht entladen werden, sodaß Pth-Arg als Trifluoracetat- bzw. Hydrochloridsalz vorliegt. Als solches ist es nicht flüchtig und in die Ionenquelle verdampfbar. Bei der Ionisierung mit Isobuten (99,95%) und Methanol (p.A., getrocknet) im C.I.-Betrieb (chemische Ionisation) wurde am Quadrupol-Massenspektrometer (Finnigan 3200, Sunnyvale, Ca.) mit einem Quellendruck von $0,75-1,0 \times 10^{-6}$ bar, bei E.I.-Betrieb (elektrische Ionisation) mit einer Ionisierungsspannung von 26-36 V gearbeitet. Diese Größe stellt einen Kompromiß dar, um bei möglichst allen Pth-Derivaten eine optimale Ausbeute an Molekularionen zu erhalten: eine höhere Spannung steigert zwar die Empfindlichkeit, führt aber notwendigerweise zu weniger Molekularionen und dementsprechend mehr Fragmentionen. Diese Verschiebung erschwert die Interpretation der Spektren.

Die Proben wurden in Mikrogläschen (5 µl) durch ein Festproben-einlaßseptum in die Ionenquelle geschleust, wo sie durch einen quasilinearen Temperaturgradienten (Raumtemperatur bis 200°C) im Hochvakuum verdampft wurden. Eine Registrierung der Ionenstromkurve gegen die Zeit liefert zusätzliche Information, da die einzelnen Aminosäurenderivate unterschiedlich flüchtig sind.

Die Vorteile der Massenspektrometrie sind offensichtlich: sie stellt das bislang einzige direkte Identifizierungsverfahren dar. Die Pth's werden als Moleküle erfaßt, mit einem von Aminosäure zu Aminosäure charakteristischen Zerfallsschema. So

kann z.B. eindeutig zwischen Ile, Leu, Hyp und Nle auf Grund ihrer Fragmente differenziert werden, obwohl alle Derivate das gleiche Molekulargewicht (= 248) besitzen. Dies gilt jedoch nicht für den C.I.-Betrieb. Hierbei resultieren nahezu ausschließlich Molekularionen. Dieser Informationsverlust wird durch die leichte Interpretierbarkeit der Spektren teilweise aufgewogen. Erwähnenswert ist auch, daß zwischen Gln/Glu bzw. Asn/Asp eindeutig unterschieden werden kann; weiter, daß Tyr und Trp einwandfrei identifizierbar sind, auch wenn diese Reste durch chemische Modifizierung (u.a. organische Säuren bei der Gelchromatographie) weitgehend zerstört wurden: Trp liefert das charakteristische Skatyl-Kation, Tyr das Tropylium-Kation, aus der Seitenkette.

2.1.9.3.3. Identifizierung durch Aminosäurenanalyse

In Fällen, in denen kein Pth-Derivat nachgewiesen werden konnte, lag der Verdacht auf Arg-Pth nahe. Arg wurde durch Hydrolyse mit HJ (56%, Suprapur) unter N_2 , 20h bei $127^\circ C$, freigesetzt und am Aminosäurenanalysator bestimmt.

2.1.10. Bestimmung der Aminosäuresequenz durch manuellen Abbau nach der Dansyl-Edman-Technik [341,342]

Von der Peptidlösung (5-40 nMol in einem Spitzgläschen mit Kegelschliff 14/23) wurde ein Aliquot (ca. 1 nMol) zur Identifizierung der N-terminalen Aminosäure mit der Dansyltechnik (s. 2.1.8.) abgezweigt, der Rest eingetrocknet. War die Lösung sauer, wurde der Rückstand wiederholt in Wasser gelöst und im Ölpumpenvakuum eingetrocknet. Dann wurde das Peptid in 100 μ l Pyridin aufgenommen, mit 100 μ l Wasser verdünnt und mit einem geeigneten Aliquot PITC - unverdünnt oder mit einer entsprechenden Menge Pyridin versetzt - umgesetzt (2-20 facher Überschuß über Aminogruppen). Der Ansatz wurde nach Durchperlen mit N_2 1h bei $45^\circ C$ inkubiert und während dieser Zeit in Abständen

kurz gerüttelt. Nach dem Eintrocknen am Ölvakuum wurden 1-3 x mit 500, μ l getrocknetem Benzol und Diethylether überschüssiges Phenylsenföhl, Pyridin und Nebenprodukte extrahiert, der Rest wiederum eingetrocknet. Durch Zugabe von 200, μ l wasserfreier TFA und 30 min-Reaktion bei 45°C wurde die N-terminale Aminosäure unter Bildung eines Heterozyklus (Ptz-Derivat) abgespalten. Die TFA wurde am Ölpumpenvakuum abgezogen, der Rückstand in 400, μ l Benzol aufgerüttelt, zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß übertragen. Das Sediment wurde in 400, μ l Diethylether aufgewirbelt, ebenfalls zentrifugiert und der Überstand mit dem Benzolüberstand vereinigt und eingetrocknet. Mit der Lösung des Sediments in 100, μ l Pyridin und Verdünnung mit 100, μ l Wasser konnte ein Aliquot zur Identifizierung des neuen N-Terminus abgenommen und ein neuer Zyklus begonnen werden.

Gelegentlich wurde das in den Benzol- und Diethyletherextrakten gewonnene Thiazolinon nach Konversion zum Thiohydantoin (Ptz- $\rightarrow$ Pth-) (s. 2.1.9.3.) im MS oder durch DC identifiziert und mit dem Ergebnis der vorangegangenen Endgruppenbestimmung nach der Dansyltechnik verglichen.

2.1.11. Bestimmung der Aminosäuresequenz durch manuellen Edman-Abbau unter Verwendung von DABITC mit direkter Identifizierung der Dabth-Aminosäuren [344]

Das Peptid (2-8 nMol in einem 1,5 ml-Spitzgläschen mit Kegelschliff 14/23) wurde in 100, μ l einer frisch bereiteten 50% Pyridinlösung aufgenommen, mit N₂ beblasen, mit 50, μ l einer frischen Lösung von DABITC in Pyridin* vermischt und nach erneutem Überblasen mit N₂ und kräftigem Rütteln 50 min bei 56°C inkubiert. Während der Reaktion wurde der Ansatz wiederholt scharf gerüttelt. Danach wurden in das Gemisch 10, μ l PITC pipettiert, N₂ eingeleitet, gerüttelt und weitere 30 min bei 56°C inkubiert. Dieses Doppelkopplungsverfahren (DABITC/PITC) ist ein Kompromiß: mit ihm erreicht man zwar nur eine Farbmarkierung von ca. 20% der verfügbaren Aminotermini, was eine Verminderung der Nachweisempfindlichkeit bedeutet, verschafft sich

andererseits aber den Vorteil einer nur geringen Anhäufung von meist bekannten und auf Grund der unterschiedlichen Färbung leicht identifizierbaren Nebenprodukten. Eine vollständige Umsetzung mit DABITC allein ist wegen der limitierten Löslichkeit des Azofarbstoffs im Kopplungsmedium schwierig und zudem von einer schnellen Akkumulation von Zersetzungsprodukten bei den erforderlichlich hohen Temperaturen (80°C) begleitet.

Nach Ablauf der PITC-Kopplungsphase wurde die Lösung 2-4 x mit je 500 µl Heptan/Ethylacetat 2/1 (v/v) extrahiert, die organische Phase abgesaugt, die wässrige eingetrocknet. Zum Rückstand wurden 100-200 µl wasserfreie TFA gegeben (N₂, rütteln), 15 min bei 56°C inkubiert, danach die TFA wieder abgezogen (stufenweise Evakuierung wegen Verzugsgefahr empfohlen) und aus dem Rückstand mit Wasser/Butylacetat 1/4 (v/v) das Thiazolinongemisch extrahiert. Die wässrige Phase wurde zur Trockne gebracht und mit der Lösung der eingetrockneten Substanz in 50% Pyridin (s. oben) der zweite Abbauzyklus gestartet.

Das in einem 1,5 ml-PP-Reaktionsgefäß evaporierte Thiazolinongemisch wurde in 50 µl Wasser und 150 µl HCl-gesättigter Essigsäure** über 50 min bei 56°C zum Thiohydantoin konvertiert und nach Trocknung in 5-30 µl Ethanol zur DC-Identifizierung gelöst. Die Nachweisgrenze der rotgefärbten Dabth-Aminosäurenderivate liegt bei ca. 10 pMol.

* DABITC-Lösung:

6 mg DABITC wurden in 2 ml Aceton gelöst, davon 100 µl-Portionen in 1,5 ml-PP-Reaktionsgefäße abgefüllt und in eingetrocknetem Zustand bei -70°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Verwendung wurden 100 µl Pyridin in eines dieser Gefäße pipettiert, das DABITC gelöst und davon 50 µl zur Peptidlösung gegeben.

** HCl-gesättigter Eisessig:

100 ml Eisessig in Schott-Flasche mit ISO-Gewinde (GL 45) und PP-Schraubkappe mit selbst angefertigtem Kelf-Einsatz wurden 4 h bei Raumtemperatur mit Chlorwasserstoffgas 2.8 (Linde, Unterschleißheim) durchperlt. Die Lösung wurde im Kühlschrank gelagert.

2.1.12. UV-Spektrophotometrie

Die Spektren 0. Ordnung im Bereich zwischen 250 und 360 nm wurden an Zweistrahlgeräten (DK-2A, Beckman Instruments, Fullerton, Ca.; Cary 118, Palo Alto, Ca.) in 1 x 1 cm bzw. 1 x 2 cm Quartzküvetten aufgenommen.

2.1.13. Radioaktivitätsmessung

10-50 μ l Peptidlösung wurden in 10 ml-Zählfläschchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (6 g Permablend III (Packard), 600 ml Toluol und 400 ml Ethylenglykolmonomethylether) pipettiert und im Szintillationszähler (Packard-Tricarb, Downers Grove, Ill.) die Radioaktivität gemessen.

2.2. Präparative Methoden

2.2.1. Gelfiltration von Peptiden

Angaben über Gelmatrices, Säulendimensionen, Elutionsmittel und Flußraten sind in den Legenden der Elutionsdiagramme zu finden.

Das chromatographische System eignete sich sowohl für analytische (z.B. 5 nMol eines Dipeptids) wie für präparative Trennungen (z.B. 10 μ Mol). Dieser rationelle Betrieb wurde durch den Einsatz empfindlicher Detektoren (Photometrie, Refraktometrie), von Kapillarsäulen (innerer Durchmesser: 0,3-0,8 cm), Mikrodurchflußküvetten (Lichtweg = 1 cm, Durchmesser der Bohrung = 0,1 cm, entsprechend einem Zellvolumen von ca. 8 μ l) und, auch bei sehr geringen Flußraten (z.B. 50 μ l/h), hochkonstant fördernden Spritzenpumpen (Synchronmotoren) ermöglicht.

Das Säuleneluat wurde durch ein Photometer mit Quecksilberdampfampe (Eppendorf, Hamburg; modifiziert) geführt, welches vom Filter- auf Monochromatorbetrieb umgerüstet worden war und automatisch zwischen zwei Linien des Quecksilberspektrums wechselte (z.B. 280/289 nm; 253/280 nm). Eine 6-fach-Wechselküvetten-Einrichtung erlaubte die gleichzeitige Messung von 6 verschiedenen Säuleneluaten. Die Ausgangssignale des Photometers wurden von einem Mehrkanal-Punktendrucker (Philips, Kassel) in Form einer 6-farbigen Punkt/Kreuz-Schreibweise auf 12 Spuren registriert. Dieses System gestattete z.B. durch Transmissions- oder Extinktionsmessung bei 280 und 289 nm auf der Basis unterschiedlicher molarer Extinktionskoeffizienten die schnelle Erfassung Trp- und/oder Tyr-haltiger und chemisch modifizierter (z.B. Citraconyl-) Substanzen (bei 280/253 nm).

Auf eine Anregung hin (W. Machleidt) wurde in unserem Labor zum ersten Mal der Einsatz der Differentialrefraktometrie als unspezifisches Detektionsverfahren erprobt und für den Routinebetrieb entwickelt. Es bewährte sich als leistungsfähige Ergänzung zur Spektral- und Festwellenlängen-Photometrie, insbesondere dann, wenn diese Detektionart wegen zu hoher Eigenabsorption der Elutionsmittel (z.B. 1% Pyridin, 80% Ameisensäure bei 253 nm) nicht mehr sinnvoll einsetzbar war. Kurze und vor allem achromophore Peptide, die früher üblicherweise an einem Spektralphotometer mit Deuteriumlampe (DK-2A mit Gilford-4 fach-Küvettenwechsler) bei 224 nm unter Verwendung wenig absorbierender Elutionsmittel (z.B. 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat; 0,05 M Triethylammoniumcarbonat etc.) detektiert wurden, lieferten - unabhängig von der Zusammensetzung des Lösungsmittels - am Differentialrefraktometer starke Signale, ohne den Verstärkungsbereich jemals voll ausgeschöpft zu haben. Ein unter normalen Bedingungen allerdings kaum spürbarer Nachteil ist die Sensitivität des Detektors auf Druck- und Temperaturschwankungen zwischen Meß- und Referenzzelle (Thermostat ist auf Raumtemperatur eingestellt: 22°C). Als einzige, aber unvermeidbare Modifikation am Gerät (R-401, Waters, Framingham, Mass.) wurden die zu- und abführenden Edelstahlkapillaren wegen korrodierender Lötstellen (konz. Ameisensäure !) am Übergang zum Küvetten-

block gegen Teflonschläuche (0,3 x 1,5 mm) ausgetauscht, deren geflanschte Enden beim Einbau in den Küvettenblock durch Einlage von Teflondichtungen eine leckfreie Verbindung ermöglichten. Als Folge dieser Modifikation mußte auf den Thermostatisierungseffekt durch Coiling der zuführenden Kapillaren im Metall verzichtet werden; dieser Verlust erwies sich jedoch als nicht störend.

Um maximale Information über die Zusammensetzung der eluierten Komponenten zu erhalten und - vor allem - keine zu übersehen, wurden UV-Detektor und Refraktometer in Serie geschaltet. Wie schon erwähnt, war dies nur solange sinnvoll, als die optische Dichte des Elutionsmittels die Kompensierbarkeit des Photodetektors nicht überforderte. Als im Betrieb und bei der Auswertung der Profile sehr praktisch erwies sich auch die vom Refraktometer signalisierte hintere Ausschlußgrenze, da die Zusammensetzung und Konzentration des Auftragsmediums nie exakt dem Elutionsmedium entsprach. Weiterhin waren Peptide während der häufig in mehreren Schritten erfolgten chromatographischen Reinigung durch Ausmessung ihrer Refraktometerpeaks halbquantitativ verfolgbar: der Refraktationsindex von Peptiden (RI) war bei unseren Messungen über einen weiten Bereich linear proportional zur Zahl der sie konstituierenden Aminosäuren.

Die Chromatographiesäulen in Längen zwischen 150 und 200 cm mit Innendurchmessern zwischen 0,3 und 1,2 cm wurden aus Duran-Glas (Schott, Mainz) angefertigt. Die ursprünglich auf die Säulenen- den aufgeklebten Plexiglas-Endstücke mit Nylonfritten waren auf Grund ihrer chemischen Unbeständigkeit gegenüber organischen Säuren nicht mehr verwendbar. Sie wurden durch Glasanschlüsse, Komponenten eines vielseitigen, chemisch weitgehend inerten Fittingsystems (Altex, Berkeley, Ca.), ersetzt. Der dazugehörige Gelträger bestand aus einer teflonisierten Metallfritte. Eine billigere, allerdings nicht totvolumenfreie Variante bildete ein Glasrohr (Innendurchmesser 0,5-1,2 cm), das mit einer Glasfritte (D2) abschloß und mit einer kurzen, dickwandigen Kapillare zum Auslauf führte. Zur Verminderung des Totraums zwischen Fritte und Schlauchanschluß (Polyethylenschlauch mit Endkonus) wurden größere, silylierte Glasperlen eingefüllt oder

Teflondrähte geeigneten Durchmessers eingepaßt. Vor dem Packen der Säulen wurden die Fritten mit einer ca. 3 mm hohen Schicht poröser, silylierter Glaskörner (Durchmesser 300-400 μ m) überlagert, um ein Verstopfen der Frittenporen durch Fines zu verhindern. Die oberen Enden der Glasrohre wurden bei beiden Variationen in der Flamme zu einer 2-2,5 mm weiten Öffnung verengt. Beim Anschluß der Säulen wurden die Konen der Polyethylen-schläuche einfach in diese Öffnungen gedreht. Diese Kuppelungen waren bis mind. 5 bar leckdicht.

Entscheidung der kristallinen α GPDH (S. 49):

Sephadex G-50 sf.
2 x 36 cm
0,1 M Pyridiniumacetat pH 5,5
10,2 ml/h

Da der Verdacht bestand, daß unter diesen Bedingungen Protein auf der Säule präzipitiert, wurde früh auf ein anderes System ausgewichen:

Sephadex G-50 fine + sf. (4:1)
oder Sephadex G-50(75) fine
4 x 36 cm
80% Ameisensäure
25 ml/h

In diesem System wurden auch die Entsalzungen nach den Modifizierungsreaktionen (Cm- bzw. Aet- α GPDH) durchgeführt.

2.2.2. Ionenaustauschchromatographie

Sie wurde, nach Austausch der Trennsäulen, am gleichen chromatographischen System durchgeführt wie die Gelfiltration von Peptiden (s. 2.2.1.). Als Säulen bewährten sich Glaskapillaren (0,1 x 100 cm) oder kurze Glasrohre (0,4 x 10 cm), deren Enden über die bereits erwähnten Fittingsysteme mit den Pumpen und Detektoren verbunden waren. Lineare wie exponentielle Salz- und/oder pH-Gradienten ließen sich durch entsprechende Steuerung des Kolbenvorschubs der Gradienten- und Mischflaschen herstellen. Eine detaillierte Beschreibung der Spritzenkonstruktion von Mischflaschen zur effektiven Vermischung der beiden Flüssigkeiten ist an anderer Stelle gegeben [347,353].

Wegen des beträchtlichen experimentellen Aufwands und der Schwierigkeit, die durch den Gradienten verursachte kontinuierliche Veränderung des Refraktationsindex in der Meßküvette durch synchrone Subtraktion gleichstarker Signale aus der Photozelle der Referenzküvette durch Perfusion einer identischen Gradientenlösung zu kompensieren, ist ein Differentialrefraktometer als Detektor bei der Ionenaustauschchromatographie wenig geeignet.

2.2.3. Reduktion niederer Oxidationsstufen von Cystein und Methionin mit DTE bzw. NaBH_4 [318,319]

Die α GPDH-Kristallsuspension wurde zentrifugiert, das Pellet in Wasser gelöst und die klare Lösung in ein Rundkölbchen überführt. Nach Zugabe weniger Tropfen TEA (Endkonz. 1%, pH 7,7) und einer DTE-Lösung (Endkonz. 50 mM) wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 37°C über Nacht rotiert, und das ausflockende Protein durch Hochheizen auf 60°C schließlich vollends denaturiert. Der klare Überstand wurde im Vakuum abrotiert und der Rückstand 3 x in 75% eiskühlem Aceton gewaschen.

Die Hauptfraktion A wurde in 80% eiskaltem Aceton mehrmals gewaschen und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 50% Ethanol suspendiert, mit einer Kleinspatelspitze NaBH_4 versetzt und im Kölbchen über Nacht bei Raumtemperatur rotiert. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel abgezogen und der salzhaltige Rückstand in 80% Ameisensäure zur Nachspaltung mit Bromcyan aufgenommen. Nach kurzem Schütteln ging das Protein in Lösung.

2.2.4. Umsetzung der Cysteine mit Aziridin (Aminoethylierung) [312,316]

Entsalzte α GPDH (5 μ Mol Untereinheit) wurde in 10 ml Umsetzungspuffer (0,2 M Natriumpyrophosphat pH 8,0, 6 M Guanidiniumchlorid, 2,5 mM EDTA) bis zur vollständigen Lösung ge-

rührt und die pH durch Titration mit 5,4 N NaOH nachgestellt. Während der Reduktion von Met(O) und Cystin mit DTE (Reagens : SH-Gruppen = 1 : 1 M/M) wurde die Proteinlösung 2 h bei 37 °C mit N₂ durchperlt. Die Alkylierung erfolgte durch 3-malige Zugabe von 250 µl Aziridin in Abständen von 10 min (Reagens : Total-SH-Gruppen = 100 : 1 M/M). Nach weiteren 30 min wurde der Ansatz zur Entsalzung der modifizierten αGPDH auf ein Molekularsieb gegeben (s. 2.2.1.). Das isolierte Protein wurde einrotiert und bis zur Bromcyanspaltung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5. Umsetzung der Cysteine mit Jodessigsäure (Carboxymethylierung) [315]

Der Reduktionsschritt wurde wie unter 2.2.4. durchgeführt. Die Alkylierung der αGPDH (10 µMol Untereinheit) erfolgte in einem Rundkölbchen in dem unter 2.2.4. angegebenen Puffer durch 1-malige Zugabe von Jodessigsäure (Reagens : Total-SH-Gruppen = 2 : 1 M/M) und Reaktion im Dunkeln über 1 h bei 37°C unter Einleitung von N₂. Die Jodessigsäure wurde vorher frisch aus Hexan umkristallisiert, in Wasser gelöst und mit 5,4 N NaOH auf den Neutralpunkt eingestellt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde überschüssiges Reagens mit 2-Mercaptoethanol verbraucht und das modifizierte Protein auf einem Molekularsieb entsalzt (s. 2.2.1.). Das isolierte Protein wurde einrotiert und bis zur Bromcyanspaltung bei -20°C aufbewahrt. Bei Verwendung von [2-¹⁴C]Jodessigsäure wurde das Isotop im Verhältnis 1:5 mit kaltem Reagens verdünnt.

2.2.6. Spaltung der Methionylbindungen mit Bromcyan [320]

Die modifizierte (Aet- bzw. Cm-) αGPDH-Untereinheit (5 µMol) wurde in 8 ml Ameisensäure gelöst, mit 2 ml Wasser verdünnt (Endkonz. der Ameisensäure ca. 80%) und mit einem Überschuß an Bromcyan (Reagens : Met = 100 : 1 M/M) 24 h bei Raumtempe-

ratur im Dunkeln gespalten (Abzug!). Anschließend wurde der Ansatz einrotiert und Reste von Bromcyan und Blausäure durch wiederholtes Lösen in konz. Ameisensäure und Einrotieren entfernt. Zur Chromatographie auf Sephadex G-75 fine bzw. Biogel P-30 (100-200 mesh) wurde der Ansatz in 100% Ameisensäure gelöst, aufgetragen und in 80% Ameisensäure eluiert.

2.2.7. Umsetzung der Lysine mit Citraconsäureanhydrid (Citraconylierung) [334]

Das Peptid (300-400 nMol) wurde in einem 5 ml-Gläschen mit flachem Boden in 1 ml 0,2 M Natriumpyrophosphat pH 8,4 gelöst bzw. suspendiert, und mit einem hohen Überschuß an CTA (Reagens : Aminogruppen = mind. 500 : 1 M/M) unter Rühren mit einem scheibenförmigen Magnetkern bei Raumtemperatur umgesetzt. Dabei wurde das Reagens in 6 5 μ l-Portionen, jeweils mit der gleichen Menge Dioxan zur Lösungsvermittlung vermischt, in ca. 5 min-Abständen zugegeben und die durch Hydrolyse des Anhydrids entstehenden sauren Äquivalente durch sorgfältige Titration mit 5,7 N NaOH neutralisiert. Die Base wurde mittels einer Mikro-Spritzenpumpe über eine kurze Teflonkapillare in die Reaktionslösung eingeleitet. Auf diese Weise war es möglich, trotz des geringen Probenvolumens den pH-Wert exakt zwischen 8,4 und 8,6 zu halten. Durch die Einbringung von Na⁺-Ionen wurde gewöhnlich das Ionenprodukt des Puffersalzes überschritten: Salzkristalle wurden vor Chromatographie des modifizierten Peptids an Biogel P-4 (200-400 mesh) in 10 mM wässriger Ammoniaklösung abzentrifugiert.

Die Citraconylierung von glasgebundenem Peptid erfolgte in ähnlicher Weise. Statt des 5 ml-Gläschens wurde die Reaktion bequemerweise in einer Mikrofilternutsche durchgeführt, wobei anstelle des Rührkerns N₂ durch den Ablaufstutzen eingeleitet wurde. Nach Umsetzung wurde das Peptid einfach auf der Fritte gewaschen (Methanol mit einer Spur TEA).

2.2.8. Umsetzung von Aminogruppen mit 4-Sulfophenylisothiocyanat (Braunitzer I-Reagens) [340]

Das Peptid (100-200) nMol wurde in einem PP-Reaktionsgefäß in 300 μ l frischem 50% Pyridin gelöst bzw. suspendiert und mit einem Überschuß an SPITC (Reagens : Aminogruppen = 15 : 1 M/M) 60 min bei 45°C unter N₂ umgesetzt. Das Reagens wurde in 2 Portionen zu je 2/3 bzw. 1/3 der Gesamtmenge in einem Abstand von 30 min zugegeben. Zusätzlich wurde zur sicheren Deprotonierung der Aminogruppen die Reaktionslösung unmittelbar nach Zugabe der 1. Portion mit 1 μ l TEA versetzt. Nach Ablauf der Reaktion wurde überschüssiges Reagens mit einem Tropfen Ethanolamin abgefangen und der Ansatz im Heizexsikkator unter Ölpumpenvakuum bei 45°C eingetrocknet. Der Rückstand wurde in 500 μ l wasserfreier TFA 30 min bei 45°C inkubiert. Dadurch wurde die N-terminale Aminosäure abgespalten, was die Gefahr einer Blockierung der α -NH₂-Gruppe durch oxidative Desulfurierung des SPtC-Peptids zum Sulfophenylcarbamyld-Derivat beseitigte. In Fällen, in denen der Zustand des N-Terminus nicht interessierte, wurde auf die Spaltungsreaktion verzichtet. Das gut lösliche Peptid wurde durch Gelchromatographie gereinigt.

2.2.9. Umsetzung von Aminogruppen mit Di-tert.-butyldicarbonat [335]

Das Peptid (300-500 nMol) wurde in einem PP-Reaktionsgefäß in 1 ml wasserfreier TFA 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und am Ölpumpenvakuum eingetrocknet. Diese Prozedur wurde wiederholt. Das in Form des Trifluoracetat-Salzes vorliegende Peptid wurde anschließend in 500 μ l DMF gelöst (schnell arbeiten, s. Bemerkung 2.1.9.1.1.) und zur Neutralisierung saurer Äquivalente 5 μ l TEA zugegeben. Die Umsetzung der Aminogruppen erfolgte in 30 min bei Raumtemperatur in einem Überschuß an dBdC (Reagens : Aminogruppen = mind. 500 : 1 M/M). Das Reagens wurde in 2 20 μ l Por-

tionen in einem Abstand von 15 min zupipettiert. Entstehendes Gas (Isobuten) konnte durch gelegentliches Belüften des Reaktionsgefäßes abziehen. Die Reaktionslösung wurde im Ölpumpen-evakuierten Exsikkator über konz. Schwefelsäure eingetrocknet und der Rückstand zum Schutz der säurelabilen ^tBoc-Bindungen sofort in 400 μ l 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6 suspendiert.

Die Modifizierung von glasgebundenem Peptid wurde in Analogie zur Citraconylierung (s. 2.2.7.) durchgeführt. Das trägerfixierte ^tBoc-Derivat wurde auf der Fritte mit DMF und Methanol (1% an TEA) gewaschen, am Wasserstrahlvakuum getrocknet und zur weiteren Behandlung (z.B. tryptische Spaltung) in einem 1,5 ml-PP-Reaktionsgefäß in 500 μ l 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6 suspendiert.

2.2.10. Umsetzung von Aminogruppen mit 1-Guanyl-3,5-dimethylpyrazolnitrat [346]

Das Polypeptid (ca. 50 nMol) wurde in einem PP-Reaktionsgefäß in 200 μ l Glycinat pH 9,8, 6 M an Guanidiniumchlorid, gelöst, die Lösung auf 0°C abgekühlt und mit 30 μ l einer 0°C kalten, wässrigen GDMP-Lösung (Endkonz. 0,2 M) zur Reaktion gebracht. Der Ansatz wurde, von gelegentlichem Rütteln unterbrochen, über 5 Tage bei 0°C gehalten. An 2. und 4. Tag wurden je 30 μ l Reagens zupipettiert, da es unter den gegebenen Bedingungen relativ schnell inaktiv wird; seine Endkonzentration betrug nach der letzten Zugabe 0,6 M. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das modifizierte Peptid über Sephadex G-25 (0,8 $\times$ 25 cm) in 10 mM wässrigem Ammoniak entsalzen, die proteinhaltigen Fraktionen einrotiert und der Rückstand lyophilisiert.

2.2.11. Spaltung mit Trypsin bzw. Chymotrypsin

Sie wurde gewöhnlich in einem 1,5 ml-PP-Reaktionsgefäß in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6 durchgeführt. Es wurde grundsätzlich frisch gelöstes TPCK-Trypsin bzw. Chymotrypsin

verwendet. Die Spaltung wurde durch Ansäuern mit Eisessig oder unmittelbar folgende Gelchromatographie beendet.

Bei trägerfixierten Peptiden wurde die Spaltungsreaktion durch einfaches Auswaschen des Enzyms mit Puffer, Methanol, TFA und wieder Methanol gestoppt.

Spaltungsbedingungen (TPCK-Trypsin):

(S. 75) Experiment I und II:

Enzym : Substrat = 1 : 80 M/M
0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6
37°C, 120 min

Experimente III und IV:

Enzym : Substrat = 1 : 50 M/M
0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6
37°C, 150 min

Experiment V:

Enzym : Substrat = 1 : 30 M/M
0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6
37°C, 150 min

(S. 95) Aet-D₁/II (trägergebunden):

Enzym : Substrat = 1 : 25 M/M
0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6
37°C, 60 min

(S. 101) SPtc- bzw. ^tBoc-Aet-C (a,b) ; Cm-C (c)
(trägergebunden)

Enzym : Substrat = 1 : 25 M/M a
0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6
37°C, 90 min
(Zugabe des Enzyms in 2 Portionen; 2.
Zugabe nach 30 min)

Enzym : Substrat = hoher Überschuß an Enzym b
0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6
37°C, 90 min
(Zugabe von je 1 Spatelspitzchen Enzym nach
jeweils 30 min)

Enzym : Substrat = 1 : 15 M/M c
0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,6
37°C, 120 min
(Einmalige Zugabe des Enzyms)

(S. 115) CT-Aet- bzw. Cm-präA (in Lösung):

Enzym : Substrat = 1 : 50 M/M
0,1 M N-Methyl-morpholiniumacetat pH 8,2
37°C, 90 min

2.2.12. Peptid-Totalhydrolyse mit Pronase P und Aminopeptidase M [326-330]

Das Peptid (5-10 nMol) wurde in einem 1,5 ml-PP-Reaktionsgefäß in 100 µl 0,1 M N-Ethylmorpholiniumacetat pH 8,0 gelöst und nach Zugabe von 10 µl Pronase P (Substrat : Enzym = 1 : 1 w/w) über 24 h bei 37°C gespalten. Vom eingetrockneten Hydrolysat wurden, zusammen mit Kontrollen, Aminosäureanalysen durchgeführt.

2.2.13. Peptid-Partialhydrolyse mit Carboxypeptidase A [354]

Zu einer Suspension von C-D_{1/II}-D₂ (20 nMol) in 200 µl 0,2 M Triethylammoniumacetat pH 8,3, 5% an Dioxan, wurden 5 µl Enzymsuspension pipettiert und der Ansatz 30 min bei 45°C inkubiert (Substrat : Enzym = 1 : 0,75 w/w). Die Verdauung wurde durch Ansäuern mit Eisessig gestoppt, das denaturierte Enzymprotein durch scharfes Zentrifugieren sedimentiert, der Überstand lyophilisiert und, zusammen mit einer Kontrolle, zur Bestimmung der C-terminal freigesetzten Aminosäuren dansyliert.

Bei der Partialhydrolyse der Polypeptide E₁-B-E₂-D_{1/I} (20 nMol) und D_{1/I}-präA-C-D_{1/II} (15 nMol) wurde im gleichen Medium mit einem Substrat-Enzym-Verhältnis von 1 : 3 bzw. 1 : 2 gearbeitet. Im ersteren Fall wurde bei Raumtemperatur über 60 min inkubiert, im letzteren bei 37°C über 120 min.

D.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Dissertation enthält Ergebnisse aus der ersten Aufklärung der Primärstruktur einer cytoplasmatischen Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (α GDH).

In der Einleitung wird das Enzym vorgestellt. Auf seine Stellung im Stoffwechsel, seine Isoenzyme in Organen des Kaninchens und seine genetische Repräsentation in verschiedenen Organismen wird näher eingegangen. Gemeinsame Strukturelemente nucleotidbindender Proteine werden aufgezeigt und Grundzüge ihrer Evolution umrissen.

Ergebnisteil:

Kommerzielle α GDH-Präparate aus Kaninchenmuskel wurden auf Homogenität und Integrität geprüft und die Stabilität des Enzymproteins in konzentrierter Ameisensäure bei Raumtemperatur untersucht.

Nach Bromcyanspaltung der mit Aziridin bzw. radioaktiv markierter Jodessigsäure modifizierten α GDH wurden, ausschließlich durch Gelfiltration, 9 Fragmente präparativ isoliert:

B (106 Reste)	E ₂ (2)	D ₂ (26)	prä-A (52)
	E ₃ (4)	D _{1/II} (32)	C (56)
	E ₁ (5)	D _{1/I} (33)	

B wurde zur weiteren Bearbeitung an Mitarbeiter abgegeben.

E₁ ist das C-terminale Fragment des an der -Asp₃₂-Pro₃₃-Bindung acidolytisch gespaltenen N-terminalen, acetylierten Bromcyanfragments der α GDH. Das N-terminale Fragment NT wurde teilcharakterisiert.

Die Homoserinpeptide E₁, E₂, D₂, D_{1/I}, D_{1/II} und C wurden, fast ausnahmslos durch automatischen Abbau in einem Festphasensequencer, total, das Peptid prä-A partiell sequenziert. Manueller Abbau wurde nur zur Sequenzierung sehr kurzer Peptide und Ansequenzierung in geringen Mengen vorliegender Polypeptide, sowie in Einzelfällen zur Absicherung kurzer Abschnitte automatisch bestimmter Sequenzen durchgeführt.

Aus verschiedenen Bromcyanansätzen wurden in analytischen Mengen 9 weitere Peptide isoliert, die Produkte unvollkommener Bromcyanspaltung darstellten. Durch automatische bzw. manuelle Sequenzierung ließen sich 3 sichere Überlappungen festlegen. Die übrigen Peptide wurden charakterisiert und so weit wie möglich per Hand nach Edman abgebaut. Die Ergebnisse erlaubten eine vorläufige Festlegung der Reihenfolge sämtlicher Bromcyanfragmente der α GPDH.

Die Sekundärstruktur der α GPDH wurde nach der Methode von CHOU und FASMAN vorhergesagt.

Die Festphasenmethode ist gegenüber der Flüssigphasenmethode mit der unumgänglichen Voraussetzung einer möglichst quantitativen kovalenten Peptidimmobilisierung am Träger verknüpft. Dieser Nachteil wird unter anderem durch die Möglichkeit zur Einführung neuer Sequenzierungsstrategien aufgewogen.

In geeigneter Weise an porösem Glas als Festphase fixierte Peptide wurden mit guten Ausbeuten gespalten und die am Träger verbliebenen C-terminalen Fragmente bis zum Ende sequenziert. Dieses Verfahren erleichtert die Sequenzbestimmung von Peptiden deren Abbau über die gesamte Länge in einem Zug nicht möglich ist.

E.

LITERATURVERZEICHNIS

1. v. Euler, H., Adler, E., Günther, G. und Hellström, H.
(1937) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 245, 217-245
 2. v. Euler, H., Adler, E. und Günther, G.
(1937) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 249, 1-15
 3. Baranowski, T.
(1949) J. Biol. Chem. 180, 535-541
 4. van Eys, J., Judd, J., Ford, J. and Womack, W.B.
(1964) Biochemistry 3, 1755-1763
 5. Machleidt, I., Machleidt, W., Otto, J., Rückl, G. und Wachter, E.
(1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., (in Vorbereitung)
 6. Pfeleiderer, G. and Auricchio, F.
(1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 53-59
 7. Beisenherz, G., Bücher, Th. and Garbade, K.H.
(1955) Methods Enzymol. 1, 391-397
 8. Bentley, P., Dickinson, F.M. and Jones, I.G.
(1973) Biochem. J. 135, 853-859
 9. Delbrück, A., Schimassek, H., Bartsch, K. und Bücher, Th
(1959) Biochem. Z. 331, 297-311
 10. Bücher, Th. und Klingenberg, M.
(1958) Angew. Chem. 70, 552-570
 11. Levy, H.R. and Vennesland, B.
(1957) J. Biol. Chem. 228, 85-96
 12. Burton, K. and Wilson, T.H.
(1953) Biochem. J. 54, 86-94
 13. Fondy, T.P., Levin, L., Sollohub, S.J. and Ross, C.R.
(1968) J. Biol. Chem. 243, 3148-3160
 14. Kozak, L.P. and Jensen, J.T.
(1974) J. Biol. Chem. 249, 7775-7781
 15. Lehmann, F.G. und Pfeleiderer, G.
(1968) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1777-1785
 16. Gonzalez-Cerezo, H.
(1973) D.Phil.Thesis, Oxford University
- Gonzalez-Cerezo, H. and Dalziel, K.
(1975) Methods Enzymol. 41, 259-264

17. White, H.B.III and Kaplan, N.O.
(1969) J. Biol. Chem. 244, 6031-6039
18. Marquardt, R.R. and Brosemer, R.W.
(1966) Biochim. Biophys. Acta 128, 454-463

Brosemer, R.W. and Marquardt, R.R.
(1966) Biochim. Biophys. Acta 128, 464-473
19. Fink, S.C. and Brosemer, R.W.
(1973) Arch. Biochem. Biophys. 158, 19-29
20. Fink, S.C., Carlson, C.W., Gurusiddaiah, S. and Brosemer, R.W.
(1970) J. Biol. Chem. 245, 6525-6532
21. Collier, G.E., Sullivan, D.T. and MacIntyre, R.J.
(1976) Biochim. Biophys. Acta 429, 316-323
22. Fernandez-Sousa, J.M., Gavilanes, J.G., Municio, A.M. and Perez-Aranda, A.
(1977) Biochim. Biophys. Acta 481, 6-24
23. Bacchi, C.J., Marcus, S.L., Lambros, C., Goldberg, B., Messina, L. and Hutner, S.H.
(1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 778-786
24. Lambros, C., Bacchi, C.J., Marcus, S.L. and Hutner, S.H.
(1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1227-1234
25. Greulach, V.A.
(1973) Plant Function and Structure, The Macmillan Company, New York, and Collier-Macmillan Publishers, London, pp. 130-132
26. v. Denffer, D., Ehrendorfer, F., Mägdefrau, K. und Ziegler, H.
(1978) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen (begründet von Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H. und Schimper, A.F.W.), Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart - New York, S. 32-33, 35-36, 70, 249-260, 270-272, 280-281, 285-287, 289-307, 356
27. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry
(1979) Enzyme Nomenclature 1978, Academic Press, New York - San Francisco - London, p. 42
28. Kito, M. and Pizer, L.I.
(1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 408-412
(1969) J. Biol. Chem. 244, 3316-3323
29. Edgar, J.R. and Bell, R.M.
(1978) J. Biol. Chem. 253, 6348-6353
30. Edgar, J.R. and Bell, R.M.
(1978) J. Biol. Chem. 253, 6354-6363

31. Borrebaek, B., Abraham, S. and Chaikoff, I.L.
(1965) Biochim. Biophys. Acta 96, 237-247
32. Cronan, J.E., Jr. and Vagelos, P.R.
(1972) Biochim. Biophys. Acta 265, 25-60
33. Lin, E.C.C.
(1976) Ann. Rev. Microbiol. 30, 535-578
34. Raetz, C.R.H.
(1978) Microbiol. Rev. 42, 614-659
35. Hsu, C.C. and Fox, C.F.
(1970) J. Bacteriol. 103, 410-416
36. Bell, R.M.
(1974) J. Bacteriol. 117, 1065-1076
37. Cronan, J.E., Jr. and Bell, R.M.
(1974) J. Bacteriol. 118, 598-605
38. Spector, D.J. and Pizer, L.I.
(1975) Methods Enzymol. 41, 249-254
39. Shonk, C.E. and Boxer, G.E.
(1964) Cancer Res. 24, 709-721
40. Schmidt, E., Schmidt, F.W. und Wildhirt, E.
(1958) Klin. Wschr. 36, 172- 176 a
227- 233 b
280- 287 c
611- 616 d
(1959) Klin. Wschr. 37, 1221-1229 e
1229-1230 f
41. Schmidt, E. und Schmidt, F.W.
(1960) Klin. Wschr. 38, 957-962
42. Bär, U., Schmidt, E. und Schmidt, F.W.
(1963) Klin. Wschr. 41, 977-988
43. Shonk, C.E., Koven, B.J., Majima, H. and Boxer, G.E.
(1964) Cancer Res. 24, 722-731
44. Shonk, C.E., Arison, R.N., Koven, B.J., Majima, H. and Boxer, G.E.
(1965) Cancer Res. 25, 206-213
45. Shonk, C.E., Majima, H., Koven, B.J. and Boxer, G.E.
(1966) Cancer Res. 26, 607-611
46. v. Fellenberg, R., Eppenberger, H., Richterich, R. und Aebi, H.
(1962) Biochem. Z. 336, 334-350
47. Schimassek, H.
(1961) Biochem. Z. 333, 463-470

48. Boxer, G.E. and Shonk, C.E.
(1960) Cancer Res. 20, 85-91
49. Löhr, G.W., Waller, H.D. und Karges, O.
(1957) Klin. Wschr. 35, 871-875
50. Löhr, G.W. und Waller, H.D.
(1959) Klin. Wschr. 37, 833-843
51. Howard, B.V., Morris, H.P. and Bailey, J.M.
(1972) Cancer Res. 32, 1533-1538
52. Zebe, H., Delbrück, A. und Bücher, Th.
(1957) Angew. Chem. 69, 65
53. Holzer, H., Glogner, P. und Sedlmayr, G.
(1958) Biochem. Z. 330, 59-72
54. Shonk, C.E., Morris, H.P. and Boxer, G.E.
(1965) Cancer Res. 25, 671-676
55. Starck, D.
(1975) Embryologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart, S. 614-622
56. Kalk, H., Schmidt, E., Schmidt, F.W. und Wildhirt, E.
(1958) Klin. Wschr. 36, 657-660
57. Wewalka, F.
(1975) in Laboratoriumsdiagnostik (Deutsch, E. und Geyer,
G., Hrsg.), Verlag Brüder Hartmann, Berlin,
S. 64-83, 675-691
58. Cronan, J.E., jr.
(1978) Ann. Rev. Biochem. 47, 163-189
59. Thompson, G.A., Jr. and Nozawa, Y.
(1972) Ann. Rev. Microbiol. 26, 249-278
60. Snyder, F. (ed.)
(1977) Lipid Metabolism in Mammals, Vol.1 and 2, Plenum
Press, New York and London

Van Golde, L.M.G.	<u>Vol.1</u>	1- 33	a
and Van den Bergh, S.G.		35-149	b
Johnston, J.K.		151-187	c
Shapiro, B.		287-316	d
Wykle, R.L.		317-366	i
Frosolono, M.F.			
Coniglio, J.G.	<u>Vol.2</u>	1- 38	e
Lee, T.-C. and Snyder, F.		83-129	f
Bailey, J.M.		293-310	g
		323-352	h

61. von Sengbusch, P.
 (1979) Molekular- und Zellbiologie, Springer-Verlag,
 Berlin - Heidelberg - New York,
 S. 264-265, 518-549 a
 215-228, 235-239, 240-246, 254, 262, b
 264-276
 412-414 c 146-156 d

62. Lehninger, A.L.
 (1975) Biochemistry, The Molecular Basis of Cell Structure
 and Function, 2nd edition, Worth Publishers, New
 York,
 pp. 383, 536-539, 630-631, a 467-472 g
 646-648, 807-828, 829- 632-636 h
 852, 977-1010 493-496, 533- i
 19, 284-291 b 536
 372, 670-675 c 481-485 k
 302-305 d
 417-440 e
 372, 624-639 f

63. Metzler, D.E.
 (1977) Biochemistry, The Chemical Basis of Living Cells,
 Academic Press, New York - San Francisco - London,
 pp. 42- 44, 284-286, 339- a 543-546 h
 343, 530-532, 666-677, 645-648 i
 709, 1000-1021 711-712 k
 110-112, 117-118 b 640-642 l
 661, 696-697, 707-710, c 588, 607-609 m
 772-773, 847-849 466-476 n
 252-298 d
 354-356, 539-543, 547- e
 551
 651-653, 674 f
 546 g

64. McMurray, W.C.
 (1977) Essentials of Human Metabolism, Harper and Row,
 Hagerstown, Md. - New York - San Francisco - Lon-
 don, pp. 166-209

65. Ansell, G.B., Hawthorne, J.N. and Dawson, R.M.C. (eds.)
 (1973) Form and Function of Phospholipids, 2nd edition,
 Elsevier, Amsterdam - London - New York

66. Agranoff, B.W. and Hajra, A.K.
 (1971) Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 68, 411-415

67. LaBelle, E.F., Jr. and Hajra, A.K.
 (1972) J. Biol. Chem. 247, 5835-5841

68. Manning, R. and Brindley, D.N.
 (1972) Biochem. J. 130, 1003-1012

69. Snyder, F. and Snyder, C.
(1975) in *Progress in Biochemical Pharmacology*, Vol.10:
Lipids and Tumors (Carroll, K.K. ed.), S. Karger,
Basel - München - Paris - London - New York - Sydney,
pp. 1-41
70. Pollock, R.J., Hajra, A.K. and Agranoff, B.W.
(1975) *Biochim. Biophys. Acta* 380, 421-435
71. Rao, G.A. and Abraham, S.
(1973) *Lipids* 8, 232-234
72. Harding, J.W., Jr., Pyeritz, E.A., Copeland, E.S. and
White, H.B.III
(1975) *Biochem. J.* 146, 223-229
73. Vernon, R.G. and Walker, D.G.
(1970) *Biochem. J.* 118, 531-536
74. Hahn, P. and Skala, J.
(1970) *Biol. Neonate* 16, 362-369
75. Timiras, P.S.
(1972) *Developmental Physiology and Aging*, The Macmillan
Company, New York, Collier-Macmillan Ltd., London
pp. 115-128
76. Boenig, H.
(1967) *Leitfaden der Entwicklungsgeschichte des Menschen*
(bearb. von Bertolini, R.), 9. Auflage, Edition
Leipzig, Leipzig, S. 268-270
77. Steinberg, D.
(1963) *Biochem. Soc. Symp.* no. 24, 111-143
78. Thurner, J.W. and Paulus, H.
(1973) in *The Enzymes* (Boyer, P.D. ed.), Vol.8, 3rd
edition, Academic Press, New York and London
pp. 487-508
79. Dixon, M. and Webb, E.C.
(1979) *Enzymes*, 3rd edition, Longman, London, p. 635
80. Lin, E.C.C.
(1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 765-795
81. Green, H. and Kehinde, O.
(1974) *Cell* 1, 113-116
82. Wise, L.S. and Green, H.
(1978) *Cell* 13, 233-242
83. Todaro, G. and Green, H.
(1963) *J. Cell. Biol.* 17, 299-313
84. Schlossman, D.M. and Bell, R.M.
(1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5738-5744

85. Kuri-Harcuch, W., Wise, L.S. and Green, H.
(1978) Cell 14, 53-59
86. Wise, L.S. and Green, H.
(1979) J. Biol. Chem. 254, 273-257
87. Waldeck, F.
(1977) in Physiologie des Menschen (Schmidt, R.F. und Thews, G., Hrsg.), 19. Auflage, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, S. 583-605
88. Thomson, A.B.R.;
Johnston, J.M.;
Zilversmit, D.B.;
(1978) in Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism (Dietschy, J.M., Gotto, A.M., Jr. and Outko, J.A., eds.), American Physiological Society, Bethesda, Md.
pp. 29-55
57-68
69-81
89. Hahn, P. and Skala, J.
(1971) Biol. Neonate 18, 433-438
90. Scheig, R.
(1974) in Duncan's Diseases of Metabolism, Genetics and Metabolism (Bondy, P.K. and Rosenberg, L.E., eds.), 7th edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia - London - Toronto, pp. 341-415
91. Ruderman, N.B., Aoki, T.T. and Cahill, G.F.;
Owen, O.E., Patel, M.S., Reichle, F.A., Block, B.S.B., Kreulen, T.H. and Mozzolo, M.A.;
(1976) in Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species (Hanson, R.W. and Mehlman, M.A., eds.), John Wiley and Sons, New York - London - Sydney - Toronto,
pp. 515-532
533-558
92. Söling, H.-D. and Kleineke, J.
(1976) in 91.
pp. 369-462
93. Weber, G. and Lea, M.A.
(1967) in Methods in Cancer Research (Busch, H., ed.), Vol.2, Academic Press, New York, pp. 523-578
94. Gee, R., McGroarthy, E., Hsieh, B., Wied, D.M. and Tolbert, N.E.
(1974) Arch. Biochem. Biophys. 161, 187-193
95. Chance, B. and Sacktor, B.
(1958) Arch. Biochem. Biophys. 76, 509-531
96. Estabrook, R.W. and Sacktor, B.
(1958) Arch. Biochem. Biophys. 76, 532-545
J. Biol. Chem. 233, 1014-1019

97. Sacktor, B.
(1958) in Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., Symposium
XII, Vienna, pp. 138-
98. Klingenberg, M. und Bücher, Th.
(1959) Biochem. Z. 331, 312-333
99. Bücher, Th., Klingenberg, M. and Zebe, E.
(1959) in 97. pp. 153-
100. Zebe, E., Delbrück, A. und Bücher, Th.
(1959) Biochem. Z. 331, 254-272
101. Sacktor, B. and Dick, A.
(1962) J. Biol. Chem. 237, 3259-3263
102. Delbrück, A., Zebe, E. und Bücher, Th.
(1959) Biochem. Z. 331, 273-296
103. Vogell, W., Bishai, F.R., Bücher, Th., Klingenberg, M.,
Pette, D. und Zebe, E.
(1959) Biochem. Z. 332, 81-117
104. Zebe, E., Delbrück, A. und Bücher, Th.
(1956) Tagung der Deutschen Gesellschaft für Physiol.
Chemie, Hamburg, Sept. 1956
(1957) Ber. ges. Physiol. exp. Pharmacol. 189, 115-
105. Zebe, E.C. and McShan, W.H.
(1957) J. Gen. Physiol. 40, 779-790
106. Watanabe, M.I. and Williams, C.M.
(1951) J. Gen. Physiol. 34, 675-689
107. Sacktor, B. and Cochran, D.
(1957) Biochim. Biophys. Acta 25, 649
108. Chefurka, W.
(1958) Biochim. Biophys. Acta 28, 660-661
109. Meyerhof, O.
(1919) Pflügers Arch. ges. Physiol. 175, 20-
110. Green, D.E.
(1936) Biochem. J. 30, 629-644
111. Kubista, V.
(1958) Biochem. Z. 330, 315-323
112. Sacks, J. and Morton, J.M.
(1956) Am. J. Physiol. 186, 221-223
113. Sacktor, B.
(1961) Ann. Rev. Entomology 6, 103-130

114. Klingenberg, M. und Slenczka, W.
(1959) Biochem. Z. 331, 334-336
115. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H. und Bücher, Th.
(1959) Biochem. Z. 332, 18-46
116. Sacktor, B., Packer, L. and Estabrook, R.W.
(1959) Arch. Biochem. Biophys. 80, 68-71
117. Klingenberg, M. und Bücher, Th.
(1960) Ann. Rev. Biochem. 29, 669-710
118. Bücher, Th. und Rüssmann, W.
(1963) Angew. Chem. 19, 881-948
119. Schimassek, H., Kadenbach, B., Rüssmann, W. und Bücher, Th.
(1963) Adv. Enzyme Regul. 1, 103-119
120. Pette, D.
(1966) in Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. and Slater, E.C., eds.), Elsevier Publishing Co., Amsterdam - London - New York, pp. 28-49
121. Klingenberg, M.
(1970) Eur. J. Biochem. 13, 247-252
122. Donnellan, J.F., Barker, M.D., Wood, J. and Beechey, R.B.
(1970) Biochem. J. 120, 467-478
123. Embden, G. und Deuticke, J.
(1934) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 230, 29-50-
124. Lehninger, A.L.
(1951) J. Biol. Chem. 190, 345-359
125. Sacktor, B.
(1970) Adv. Insect Physiol. 7, 267-347
126. Kammer, A.E. and Heinrich, B.
(1978) Adv. Insect Physiol. 13, 133-228
127. Crabtree, B. and Newsholme, E.A.
(1969) Biochem. J. 114, 80P-81P
(1972) 126, 49-58
128. Borst, P.
(1962) Biochim. Biophys. Acta 57, 256-270
129. Palmieri, F., Quagliariello, E. and Klingenberg, M.
(1972) Eur. J. Biochem. 29, 408-416
130. Usatenko, M.S.
(1977) Biochemistry USSR 42, 237-244

131. Hochachka, P.W., Hulbert, W.C. and Guppy, M.
(1978) in Physiological Ecology of Tuna (Dizon, A. and Sharp, G., eds.), Academic Press, New York - San Francisco - London,
132. Guppy, M. and Hochachka, P.W.
(1978) J. Biol. Chem. 253, 8465-8469
133. Rovetto, M.J., Lamberton, W.F. and Neely, J.R.
(1975) Circ. Res. 37, 742-751
134. Eddington, D.W., Ward, G.R. and Saville, W.A.
(1973) Am. J. Physiol. 224, 1375-1380
135. Carnicero, H.H., Moore, C.L. and Hoberman, H.D.
(1972) J. Biol. Chem. 247, 418-426
136. Van Dam, K. and Meijer, A.J.
(1971) Ann. Rev. Biochem. 40, 115-160
137. Meijer, A.J. and Van Dam, K.
(1974) Biochim. Biophys. Acta 346, 213-244
138. Brosemer, R.W., Vogell, W. und Bücher, Th.
(1963) Biochem. Z. 338, 854-910
139. Vogell, W.
(1965) Naturwissenschaften 52, 405-418
140. Pette, D.
(1965) Naturwissenschaften 52, 597-616
141. Warburg, O.
(1926) Über den Stoffwechsel der Tumoren, Springer-Verlag, Berlin
142. Boxer, G.E. and Devlin, T.M.
(1961) Science 134, 1495-1501
143. Bissell, M.J., Rambeck, W.A., White, R.C. and Bassham, J.A.
(1976) Science 191, 856-858
144. Grant, P.T. and Sargent, J.R.
(1960) Biochem. J. 76, 229-237
(1961) 81, 206-214
145. Grant, P.T., Sargent, J.R. and Ryley, J.F.
(1961) Biochem. J. 81, 200-206
146. Müller, M.
(1975) Ann. Rev. Microbiol. 29, 467-483
147. Hill, G.C.
(1976) Biochim. Biophys. Acta 456, 149-193

148. Mulligan, H.W. (ed.)
(1970) *The African Trypanosomiasis*, John Wiley, New York
149. Losos, G.J. and Ikede, B.O.
(1972) *Vet. Pathol.* 9 (Suppl.), 1-71
150. Tizard, I., Nielsen, K.H., Seed, J.R. and Hall, J.E.
(1978) *Microbiol. Rev.* 42, 661-681
151. Oppendoes, F.R., Borst, P., Bakker, S. and Leene, W.
(1977) *Eur. J. Biochem.* 76, 29-39

Oppendoes, F.R., Borst, P. and Spits, H.
(1977) *Eur. J. Biochem.* 76, 21-28
152. von Brand, T.
(1951) in *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, Vol.1,
(Lwoff, A., ed.), Academic Press, New York,
pp. 181-
153. Houštěk, J., Cannon, B. and Lindberg, O.
(1975) *Eur. J. Biochem.* 54, 11-18
154. Steiner, G. and Cahill, G.F.
(1964) *Am. J. Physiol.* 207, 840-844
155. Dawkins, M.J.R. and Hull, D.
(1964) *J. Physiol.* 172, 216-238
156. Ohkawa, K.-I., Vogt, M.T. and Farber, E.
(1969) *J. Cell Biol.* 41, 441-449
157. Chaffee, R.R.J., Allen, J.R., Cassuto, Y. and Smith, R.E.
(1964) *Am. J. Physiol.* 207, 1211-1214
158. Markert, C.L. (ed.)
(1975) *Isoenzymes*, Vol.I: Molecular Structure, Vol.II:
Physiological Funktion, Vol.III: Developmental
Biology, Vol.IV: Genetics and Evolution (Proc.
of the 3rd Intern. Congr. on Isozymes, Yale Uni-
versity), Academic Press, New York - San Francis-
co - London
159. Rattazzi, M.C., Scandalios, J.G. and Whitt, G.S. (eds.)
(1975-1977) *Isoenzymes: Current Topics in Biological
and Medical Research* 1-3, Alan R. Riss,
New York
160. Wagner, R.P. and Selander, R.K.
(1974) *Ann. Rev. Entomol.* 19, 117-138
161. Eppenberger, H.M.
(1975) in *The Biochemistry of Animal Development* (Weber,
R., ed.), Vol.III: Molecular Aspects of Animal
Development, Academic Press, New York - San Fran-
cisco - London, pp. 217-255

162. Tsao, M.U.
(1960) Arch. Biochem. Biophys. 90, 234-238
163. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.-H., Meyer-Arendt, E. und Pfleiderer, G.
(1953) Z. Naturforsch. Teil B 8, 555-577
164. Van Eys, J., Nuenke, B.J. and Patterson, M.K., Jr.
(1959) J. Biol. Chem. 234, 2308-2313
165. Ankel, H., Bücher, Th. und Czok, R.
(1960) Biochem. Z. 332, 315-327
166. Czok, R. and Bücher, Th.
(1960) Adv. Prot. Chem. 15, 315-415
167. Baranowski, T.
(1963] in The Enzymes (Boyer, P.D., Lardy, H. and Myr-
bäck, K., eds.), Vol.7, 2nd edition, Academic
Press, New York - London, pp. 85-96
168. Lee, Y.-P. and Craine, J.E.
(1971) J. Biol. Chem. 246, 7616-7622
169. Otto, J., Raggi, A., Machleidt, W. and Bücher, Th.
(1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 332-344
170. Lee, Y.-P., Craine, J.E. and Lee, A.S.-T.
(1973) J. Biol. Chem. 248, 5610-5615
171. Warkentin, D.L. and Fondy, T.P.
(1973) Eur. J. Biochem. 36, 97-109
172. Lee, Y.-P. and Choy, P.C.C.
(1974) J. Biol. Chem. 249, 476-481
173. Ostro, M.J. and Fondy, T.P.
(1977) J. Biol. Chem. 252, 5575-5583
174. McLoughlin, D.J., Shahied, I.I. and MacQuarrie, R.
(1978) Arch. Biochem. Biophys. 188, 78-82
175. McLoughlin, D.J., Shahied, I.I. and MacQuarrie, R.
(1978) Biochim. Biophys. Acta 527, 204-211
176. McLoughlin, D.J. and MacQuarrie, R.
(1978) Biochim. Biophys. Acta 527, 204-211
177. Kornbluth, R., Tracy, P.S. and Fondy, T.P.
(1979) Biochim. Biophys. Acta 568, 273-286
178. Fondy, T.P., Herwig, K.J., Sollohub, S.J. and Ruther-
ford, D.B.
(1971) Arch. Biochem. Biophys. 145, 583-590
179. Ross, C.R., Curry, S., Schwartz, A.W. and Fondy, T.P.
(1971) Arch. Biochem. Biophys. 145, 591-603

180. Fondy, T.P., Solomon, J. and Ross, C.R.
(1971) Arch. Biochem. Biophys. 145, 604-611
181. McGinnes, J.F. and DeVellis, J.
(1974) Biochim. Biophys. Acta 364, 17-27
(1977) Arch. Biochem. Biophys. 179, 682-689
182. Kozak, L.P. and Erdelsky, K.J.
(1975) J. Cell Physiol. 85, 437-448
183. Kozak, L.P. and Murphy, E.D.
(1976) Cancer Res. 36, 3711-3717
184. Rittmann, L.W., Johnston, S.M. and Fondy, T.P.
(1977) Cancer Res. 37, 2673-2679
185. Kozak, L.P.
(1977) Develop. Biol. 55, 160-169
(1978) 56, 593-600
186. Beckman, G.
(1978) in The Biochemical Genetics of Man (Brock, D.J.H. and Mayo, O., eds.), 2nd edition, Academic Press, London - New York - San Francisco, pp. 186-269
187. McGinnes, J.F. and DeVellis, J.
(1979) Fed. Proc. 38, 531
188. Behnke, J.N.
(1973) Ph.D. Dissertation, Michigan State University
189. Rouslin, W.
(1967) Fed. Proc. 26, 557
190. White, H.B.III and Kaplan, N.O.
(1969) J. Mol. Evol. 1, 158-172
191. White, H.B.III
(1975) Methods Enzymol. 41, 245-249
192. Senkbeil, E. and White, H.B.III
(1978) J. Mol. Evol. 11, 57-66
193. Grell, E.H.
(1967) Science 158, 1319-1320
194. Wright, D.A. and Shaw, C.R.
(1969) Biochem. Genet. 3, 343-353
195. Rechsteiner, M.C.
(1970) J. Insect Physiol. 16, 1179-1192, 957-977
196. Bewley, G.C., Rawls, J.M., Jr. and Lucchesi, J.C.
(1974) J. Insect Physiol. 20, 153-165
197. Miller, S., Percy, R.W. and Berger, E.
(1975) Biochem. Genet. 13, 175-188

198. O'Brien, S.J. and MacIntyre, R.J.
(1972) *Biochem. Genet.* 7, 141-161
199. Mullinax, T.R., Niesel, D.W., Miller, S.G., Bewley, G.C.,
Armstrong, F.B. and Knopp, J.A.
(1978) *Fed. Proc.* 37, 1796
200. Bewley, G.C. and Miller, S.
(1979) *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical
Research* 3, 23-52
201. Berger, E. and Miller, S.
(1979) *Insect Biochem.* 9, 355-364
202. Brosemer, R.W., Grosso, D.S., Estes, G. and Carlson, C.W.
(1967) *J. Insect Physiol.* 13, 1757-1767
203. Fink, S.C. and Brosemer, R.W.
(1975) *Methods Enzymol.* 41, 240-245
204. Pappas, P.W. and Rodrick, G.E.
(1971) *Comp. Biochem. Physiol.* 40B, 709-713
205. Gilbert, L.T.
(1967) *Adv. Insect Physiol.* 4, 69-211
206. Kilby, B.
(1963) *Adv. Insect Physiol.* 1, 111-174
207. Black, W.J.
(1966) *Can. J. Biochem.* 44, 1301-1317
208. Bentley, P. and Dickinson, F.M.
(1974) *Biochem. J.* 143, 19-27
209. McLoughlin, D.J.
(1977) Ph.D. Dissertation, University of Missouri, Kansas
City
210. Fondy, T.P., Ross, C.R. and Sollohub, S.J.
(1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1631-1644
211. Kim, S.J. and Anderson, B.M.
(1969) *J. Biol. Chem.* 244, 231- 235
1547-1551
212. Suarez, Z. and Apitz-Castro, R.
(1972) *Biochim. Biophys. Acta* 258, 339-342
213. Martinenko, F.P.
(1961) *Ukr. Biokhim. Zh.* 33, 476-488
214. Blanchaer, M.C.
(1965) *Can. J. Biochem.* 43, 17-24

215. Nagradova, N.K.
(1959) Biochemistry USSR 24, 315-323
216. Sellinger, O.Z. and Miller, O.N.
(1959) Nature 183, 889-890
217. Hochachka, P.W. and Storey, K.B.
(1975) Science 187, 613-621
218. Woods, H.F. and Krebs, H.A.
(1971) Biochem. J. 125, 129-139
219. Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, N.B., Lea, M.A. and Fisher, E.A.
(1966) Adv. Enzyme Regul. 4, 59-81
220. Theorell, H.
(1970) in Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases (Sund, H., ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 121-126
221. Jörnvall, H.
(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1096-1099
222. Markert, C.L.
(1977) Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research 1, 1-17
223. Lutstorff, U.M. and von Wartburg, J.P.
(1969) FEBS Lett. 5, 202-205
224. Gee, R., Krahling, J.B. and Tolbert, M.E.
(1976) Abs. Pap. 172nd ACS Nat. Meeting, San Francisco, Aug.29-Sept.3,1976, Abstract 149
225. Kozak, L.P.
(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3170-3174
226. Eicher, E.M.
(1976) Mouse News Lett. 54, 41
227. Chapman, V.M. and Ruddle, F.H.
(1972) Genetics 70, 299-305
228. Weinhouse, S. and Ono, T. (eds.)
(1972) Isoenzymes and Enzyme Regulation in Cancer, University of Tokyo Press, Tokyo, Japan
229. Shapira, F.
(1973) Adv. Cancer Res. 18, 77-153
230. Farina, F.A., Shatton, J.B., Morris, H.P. and Weinhouse, S.
(1974) Cancer Res. 34, 1439-1446
231. Markert, C.L.
(1968) Cancer Res. 28, 1908-1914

232. Kömpf, J., Ritter, H. und Schmitt, J.
(1971) Humangenetik 13, 75-77
233. Kömpf, J., Ritter, H. und Schmitt, J.
(1972) Humangenetik 14, 103-106
234. Hopkinson, D.A., Peters, J. and Harris, H.
(1974) Ann. Hum. Genet. 37, 477-484
235. Hopkinson, D.A., Edwards, Y.H. and Harris, H.
(1976) Ann. Hum. Genet. 39, 383-411
236. Collier, G.E. and MacIntyre, R.J.
(1977) Nature 267, 839-841
237. O'Brien, S.J. and MacIntyre, R.J.
(1972) Genetics 71, 127-138
(1978) in The Genetics and Biology of Drosophila (Ashburner, M. and Wright, T.R.F., eds.), Vol.2a, Academic Press, London - New York - San Francisco, pp. 395-551
238. O'Brien, S.J. and Gethmann, R.C.
(1973) Genetics 75, 155-167
239. Sacktor, B. and Hurlbut, E.C.
(1966) J. Biol. Chem. 241, 632-634
240. Crabtree, B. and Newsholme, E.A.
(1975) in Insect Muscle (Usherwood, P.N.R., ed.), Academic Press, London, pp. 405-501
241. Brosemer, R.W.
(1967) J. Insect Physiol. 13, 685-690
242. Brosemer, R.W.
(1965) Biochim. Biophys. Acta 96, 61-65
243. O'Brien, S.J. and Shimada, Y.
(1974) J. Cell Biol. 63, 864-882
244. Brändén, C.I. and Rossmann, M.G.
(1970) in Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases (Sund, H., ed.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 133-134
245. Otto, J.
(1970) Dissertation, Universität München, Nat.Fak.
246. Rossmann, M.G., Liljas, A., Brändén, C.I. and Banaszak, L.J.
(1975) in The Enzymes (Boyer, P.D., ed.), Vol.XI, Academic Press, New York - San Francisco - London, pp. 61-102

247. Rossmann, M.G., Garavito, R.M. and Eventoff, W.
(1977) in Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases
(Sund, H., ed.), de Gruyter-Verlag, Berlin - New
York, pp. 3-28
248. Biesecker, G., Harris, J.I., Thierry, J.C., Walker, J.E.
and Wonacott, A.J.
(1977) Nature 266, 328-333
249. Schulz, G.E. and Schirmer, R.H.
(1974) Nature 250, 142-144
250. Schulz, G.E., Elzinga, M., Marx, F. and Schirmer, R.H.
(1974) Nature 250, 120-123
251. Sachsenheimer, W. and Schulz, G.E.
(1977) J. Mol. Biol. 114, 23-36
252. Blake, C.C.F. and Evans, R.R.
(1971) J. Mol. Biol. 84, 585-601
253. Bryant, T.N., Watson, H.C. and Wendell, P.L.
(1974) Nature 247, 14-17
254. Banks, R.D., Blake, C.C.F., Evans, P.R., Haser, R., Rice,
D.W., Hardy, G.W., Merrett, M. and Phillips, A.W.
(1979) Nature 279, 773-777
255. Evans, P.R. and Hudson, P.J.
(1979) Nature 279, 500-504
256. Fletterick, R.J., Bates, D.J. and Steitz, T.A.
(1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 38-42
257. Steitz, T.A., Fletterick, R.J., Anderson, W.F. and
Anderson, C.M.
(1976) J. Mol. Biol. 104, 197-222
258. Bennett, W.S. and Steitz, T.A.
(1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4848-4852
259. Levine, M., Muirhead, H., Stammers, D.K. and Stuart, D.I.
(1978) Nature 271, 626-630
260. Fletterick, R.J., Sygusch, J., Semple, H. and Madsen,
N.B.
(1976) J. Biol. Chem. 251, 6142-6146
261. Sprang, S. and Fletterick, R.J.
(1979) J. Mol. Biol. 131, 523-551
262. Wright, C.S., Alden, R.A. and Kraut, J.
(1969) Nature 221, 235-242
263. Drenth, J., Hol, W.G.J., Jansonius, J.N. and Koekoek, R.
(1971) Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 36, 107-116

264. Kraut, J., Robertus, J.D., Birktoft, J.J., Alden, R.A., Wilcox, P.E. and Powers, J.C.
(1971) Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 36, 117-123
265. Andersen, R.D., Apgar, P.A., Burnett, R.M., Darling, G.D., LeQuesne, M.E., Mayhew, S.G. and Ludwig, M.L.
(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3189-3191
266. Burnett, R.M., Darling, G.D., Kendall, D.S., LeQuesne, M. E., Mayhew, S.G., Smith, W.W. and Ludwig, M.L.
(1974) J. Biol. Chem. 249, 4383-4392
267. Watenpaugh, K.D., Sieker, L.C., Jensen, L.H., Legall, J. and Dubourdieu, M.
(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3185-3188
268. Watenpaugh, K.D., Sieker, L.C. and Jensen, L.H.
(1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 3857-3860
269. Smith, W.W., Burnett, R.M., Darling, G.D. and Ludwig, M.L.
(1977) J. Mol. Biol. 117, 195-225
270. Smit, J.D.G.
(1973) Ph.D. Thesis, University of Gröningen, Holland
271. Ploegman, J.H., Drent, G., Kalk, K.H. and Hol, W.G.J.
(1978) J. Mol. Biol. 123, 557-594
(1979) , 127, 149-162
272. Schulz, G.E., Schirmer, R.H., Sachsenheimer, W. and Pai, E.F.
(1978) Nature 273, 120-124
273. Matthews, D.A., Alden, R.A., Bolin, J.T., Freer, S.T., Hamlin, R., Xuong, N., Kraut, J., Poe, M., Williams, M. and Hoogsteen, K.
(1977) Science 197, 452-455
274. Matthews, D.A., Alden, R.A., Bolin, J.T., Filman, D.J., Freer, S.T., Hamlin, R., Hol, W.G.J., Kisliuk, R.L., Pastore, E.J., Plante, L.T., Xuong, N. and Kraut, J.
(1978) J. Biol. Chem. 253, 6946-6954
275. Quioco, F.A., Gilliland, G.L. and Phillips, G.N., Jr.
(1977) J. Biol. Chem. 252, 5142-5149
276. Quioco, F.A., Gilliland, G.L., Miller, D.M. and New-comer, M.E.
(1977) J. Supramol. Struct. 6, 503-518
277. Eventoff, W. and Rossmann, M.G.
(1975) in CRC Critical Reviews in Biochemistry (Fasman, G.D., ed.), CRC Press, Cleveland, Ohio
pp. 110-140
278. Ohlsson, I., Nordström, B. and Brändén, C.I.
(1974) J. Mol. Biol. 89, 339-354

279. Brändén, C.I., Jörnvall, H., Eklund, H. and Furugren, B.
(1975) in 246. pp. 103-190
280. Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J. and Rossmann, M.G.
(1975) in 246. pp. 191-292
281. Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M. and Nyc, J.F.
(1975) in 246. pp. 293-367
282. Banaszak, L.J. and Bradshaw, R.A.
(1975) in 246. pp. 369-396
283. Levitt, M. and Chothia, C.
(1976) *Nature* 261, 552-558
284. Richardson, J.S.
(1977) *Nature* 268, 495-500
285. Rossmann, M.G. and Argos, P.
(1977) *J. Mol. Biol.* 109, 99-129
286. Sternberg, M.J.E. and Thornton, J.M.
(1977) *J. Mol. Biol.* 110, 269-283
285-296
(1978) *Nature* 271, 15-20
287. Schulz, G.E.
(1977) *Angew. Chem.* 89, 24-33
288. Schulz, G.E. and Schirmer, R.H.
(1979) *Principles of Protein Structure* (Cantor, C.R., ed.),
Springer-Verlag, New York - Heidelberg - Berlin,
pp. 66-107, 166-205, 206-232
289. Buehner, M., Ford, G.C., Moras, D., Olsen, K.W. and
Rossmann, M.G.
(1974) *J. Mol. Biol.* 90, 25-49
290. Rossmann, M.G., Moras, D. and Olsen, K.W.
(1974) *Nature* 250, 194-199
291. Schidlowski, M.
(1978) in *Origin of Life* (Noda, H., ed.), Proc. of the
2nd ISSOL Meeting, The 5th ICOL Meeting, Center
for Academic Publication Japan/Japan Scientific
Societies Press, Tokyo, Japan
pp. 3-20
292. Schopf, J.W.
(1978) in *Evolution* (Flanagan, D., ed.), Scientific Ame-
rican, W.H. Freeman and Co., San Francisco
pp. 49-64
293. Schwartz, R.M. and Dayhoff, M.O.
(1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure*
(Dayhoff, M.O., ed.), Vol.5, Supplement 3,
National Biomedical Research Foundation, Washing-
ton D.C. pp. 28-29

294. Dayhoff, M.O. and Schwartz, R.M.
(1978) in 291. pp. 547-560
295. Broda, E.
(1975) *The Evolution of the Bioenergetic Processes*,
Pergamon Press, Oxford - New York - Toronto -
Sydney - Paris - Frankfurt
p. 78
296. Jukes, T.H. and Cantor, C.R.
(1969) in *Mammalian Protein Metabolism* (Munro, H.N.,
ed.), Vol.3, Academic Press, New York
pp. 21-132
297. Walker, G.W.R.
(1978) in 291. pp. 479-488
298. Ishigami, M. and Nagano, K.
(1975) *Origins Life* 6, 551-560
299. Dillon, L.S.
(1973) *Bot. Rev.* 39, 301-345
300. Jukes, T.H.
(1973) *Nature* 246, 22-26
301. Assfalg, I.G.
(1976) *Dissertation, Fachb. Chemie u. Pharmazie*,
Universität München
302. Laemmli, U.K.
(1970) *Nature* 227, 680-685
303. Mirault, M.E. and Scherer, K.
(1971) *Eur. J. Biochem.* 23, 372-386
304. Abt. Molekulare Biologie der Genwirkung (Leiter:
Prof. Dr. W. Zillig)
Methodensammlung, Stand 1977
305. Rabussay, D. and Zillig, W.
(1969) *FEBS Lett.* 5, 104-106
306. Gray, W.R.
(1972) *Methods Enzymol.* 25, 121-138
307. Weigele, M., De Bernardo, S.L., Teng, J.P. and
Leimgruber, W.
(1972) *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5927-5928
308. Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W.,
Leimgruber, W. and Weigele, M.
(1972) *Science* 178, 871-872
309. Felix, A.M. and Jimenez, M.H.
(1974) *J. Chromatogr.* 89, 361-364

310. Lai, C.Y.
(1977) *Methods Enzymol.* 47, 236-243
311. Reindel, F. und Hoppe, W.
(1954) *Chem. Ber.* 87, 1103-1107
312. Raftery, M.A. and Cole, R.D.
(1963) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10, 467-472
313. Piskiewicz, D., Landon, M. and Smith, E.L.
(1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1173-1178
314. Machleidt, W. and Machleidt, I.
(1977) in *Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis*
(Previero, A. and Coletti-Previero, M.A., eds.),
North-Holland Publishing Co., Amsterdam - New York
- Oxford,
pp. 233-246
315. Crestfield, A.M., Moore, S. and Stein, W.H.
(1963) *J. Biol. Chem.* 238, 622-627

Hirs, C.H.W.
(1967) *Methods Enzymol.* 11, 199-203

Gurd, F.R.N.
(1972) *Methods Enzymol.* 25, 424-438
316. Cole, D.
(1967) *Methods Enzymol.* 11, 315-317
317. Ellman, G.L.
(1959) *Arch Biochem. Biophys.* 82, 70-77
318. Cleland, W.W.
(1964) *Biochemistry* 3, 480-482
319. Autorenkollektiv
(1973) in *Organikum*, 12. Auflage, VEB Deutscher Verlag
der Wissenschaften, Berlin
S. 547ff.
320. Gross, E. and Witkop, B.
(1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 1510-1511
321. Horn, M.J. and Laursen, R.A.
(1973) *FEBS Lett.* 36, 285-288
322. Machleidt, W. and Wachter, E.
(1977) *Methods Enzymol.* 47, 263-277
323. Laursen, R.A.
(1966) *J. Am. Chem. Soc.* 88, 5344-5346
(1971) *Eur. J. Biochem.* 20, 89-102
324. Wachter, E., Machleidt, W., Hofner, W. and Otto, J.
(1973) *FEBS Lett.* 35, 97-102

325. Machleidt, W., Wachter, E., Scheulen, M. and Otto, J.
(1973) FEBS Lett. 37, 217-220
326. Nomoto, M. and Narahashi, Y.
(1959) J. Biochem. (Tokyo) 46, 653-667
327. Smyth, D.G.
(1967) Methods Enzymol. 11, 214-231
328. Narahashi, Y.
(1970) Methods Enzymol. 19, 651-664
329. Pfleiderer, G., Celliers, P.G., Stanulavic, M., Wachsmuth, E.D., Determann, H. und Braunitzer, G.
(1964) Biochem. Z. 340, 552-564
330. Pfleiderer, G.
(1970) Methods Enzymol. 19, 514-521
331. Wachter, E.
(1970) Dissertation, Fak. f. allg. Wissenschaften,
Technische Hochschule München
332. Edman, P. and Begg, G.
(1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-91
333. Laursen, R.A.
(1975) in Solid Phase Methods in Protein Sequence
Analysis (Laursen, R.A., ed.), Pierce Chemical
Company, Rockford, Ill., pp. 3-9
334. Dixon, H.B.F. and Perham, R.N.
(1968) Biochem. J. 109, 312-314
335. Moroder, L., Hallett, A., Wünsch, E., Keller, O. and
Wersin, G.
(1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1651-1653
336. Laursen, R.A.
(1977) Methods Enzymol. 47, 277-288
337. Laursen, R.A., Horn, M.J. and Bonner, H.G.
(1972) FEBS Lett. 21, 67-70
338. Carlsson, J., Svenson, A. and Ryden, L.
(1977) in 314. pp. 29-37
339. Bridgen, J.
(1975) FEBS Lett. 50, 159-162
340. Braunitzer, G., Schrank, B. and Ruhfus, A.
(1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1589-1590
341. Gray, W.R. and Hartley, B.S.
(1963) Biochem. J. 89, 379-380

342. Gray, W.R.
(1972) *Methods Enzymol.* 25, 333-344
343. Kulbe, K.D.
(1974) *Anal. Biochem.* 59, 564-573
344. Chang, J.Y.
(1977) *Thesis, Australian National University*

Chang, J.Y., Brauer, D. and Wittmann-Liebold, B.
(1977) *FEBS Lett.* 93, 205-214
345. Edelhoch, H.
(1967) *Biochemistry* 6, 1948-1954
346. Habeeb, A.F.S.A.
(1959) *Biochim. Biophys. Acta* 34, 294-296
(1960) *Can. J. Biochem. Physiol.* 38, 493-
(1961) 39, 729-
(1972) *Methods Enzymol.* 25, 558-566
347. Machleidt, W.
(1968) *Dissertation, Med. Fak., Universität München*
348. Laursen, R.A., Bonner, A.G. and Horn, M.J.
(1975) in *Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis*
(Perham, R.N., ed.), Academic Press, New York
349. Machleidt, W., Hofner, H. and Wachter, E.
(1975) in *Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis*
(Laursen, R.A., ed.), Pierce Chemical Company,
Rockford, Ill., pp. 17-30
350. Wachter, E., Hofner, H. and Machleidt, W.
(1975) in 349. pp. 31-46
351. Previero, A., Derancourt, J., Colletti-Previero, M.-A.
and Laursen, R.A.
(1973) *FEBS Lett.* 33, 135-138
352. König, W. and Geiger, R.
(1970) *Chem. Ber.* 103, 788-798
353. Machleidt, W., Kerner, W. und Otto, J.
(1970) *Z. Anal. Chem.* 252, 151-158
354. Ambler, R.P.
(1967) *Methods Enzymol.* 11, 436-445
(1972) 25, 262-272
355. Liljas, A. and Rossmann, M.G.
(1974) *Ann. Rev. Biochem.* 43, 475-507
356. Matthews, B.M.
(1975) in *The Proteins* (Neurath, H. and Hill, R.L., eds.),
3rd edition, Academic Press, New York pp. 404-507

357. Singleton, R., Kimmel, J.R. and Amelunxen, R.E.
(1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1623-1630
358. Suzuki, K. and Harris, J.I.
(1971) *FEBS Lett.* 13, 217-220
359. Hocking, J.D. and Harris, J.I.
(1973) *FEBS Lett.* 34, 280-284
(1976) in *Enzymes and Proteins from Thermophilic Micro-organisms* (Zuber, H., ed.), Birkhäuser-Verlag
pp. 121-133
360. Harris, J.I. and Walker, J.E.
(1977) in 247. pp. 43-58
361. Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M. and White, F.H., Jr.
(1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47, 1309-1314
362. Anfinsen, C.B.
(1973) *Science* 181, 223-230
363. Wetlaufer, D.B. and Ristow, S.
(1973) *Ann. Rev. Biochem.* 42, 135-158
364. Schulz, G.E. and Schirmer, R.H.
(1979) in 288. pp. 108-130
365. Chou, P.Y. and Fasman, G.D.
(1974) *Biochemistry* 13, 211-222
222-245
366. Chou, P.Y. and Fasman, G.D.
(1978) *Adv. Enzymol.* 47, 45-148
(1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47, 251-276
367. Chou, P.Y. and Fasman, G.D.
(1977) *J. Mol. Biol.* 115, 135-175
368. Lewis, P.N., Momany, F.A. and Scheraga, H.A.
(1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2293-2297
369. Tanaka, S. and Scheraga, H.A.
(1976) *Macromolecules* 9, 168-182
370. Heil, A., Müller, G., Noda, L.H., Pinder, T.,
Schirmer, I., Schirmer, R.H. and von Zabern, I.
(1974) *Eur. J. Biochem.* 43, 131-144
371. Allen, G. and Wittmann-Liebold, B.
(1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 1509-1525
372. Schulz, G.E., Barry, C.D., Friedman, J., Chou, P.Y.,
Fasman, G.D., Finkelstein, A.V., Lim, V.I., Ptitsyn,
O.B., Kabat, E.A., Wu, T.T., Levitt, M., Robson, B.
and Nagano, K.
(1974) *Nature* 250, 140-142

F.

ABKÜRZUNGEN

In Anlehnung an die Empfehlungen der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN):

A	Ala	Alanin	
B	Asx	Asparagin(säure)	
C	Cys	Cystein	
D	Asp	Asparaginsäure	
E	Glu	Glutaminsäure	
F	Phe	Phenylalanin	
G	Gly	Glycin	
H	His	Histidin	
I	Ile	Isoleucin	
K	Lys	Lysin	
L	Leu	Leucin	
M	Met	Methionin	Met(O) -sulfoxid
N	Asn	Asparagin	Met(O) ₂ -sulfon
P	Pro	Prolin	
Q	Gln	Glutamin	
R	Arg	Arginin	
S	Ser	Serin	
T	Thr	Threonin	
V	Val	Valin	
W	Trp	Tryptophan	
X	-	Unbekannt	
Y	Tyr	Tyrosin	
Z	Glx	Glutamin(säure)	
	Hse	Homoserin	
	Hse>	Homoserinlacton	
	Nle	Norleucin	
	Hyp	Hydroxyprolin	

Aet-	Aminoethyl-
Cm-	Carboxymethyl-
Ac-	Acetyl-
t _{Boc} -	tert.-Butoxycarbonyl-

AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adosintriphosphat
Dansyl- Dns-	5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
Ptc-	Phenylthiocarbamoyl-
Pth-	-phenylthiohydantoin
Ptz-	-phenylthiazolinon
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Abkürzungen von Chemikalien siehe auch S. 144-145

A	Absorption	
R	Radioaktivität	Symbole
RI	Refraktionsindex	siehe S. 54
DC	Dünnschichtchromatographie	
GC	Gaschromatographie	
MS	Massenspektrometrie	

LEBENS LAUF

Am 17. Mai 1946 wurde ich als zweites von vier Kindern des Schlossers Alois Rückl und seiner Ehefrau Katharina, geb. Langenfelder, in Plattling geboren. Meine Eltern mußten 1945 aus ihrer Heimat, dem Böhmerwald, flüchten.

Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Plattling, trat dann in das Humanistische Gymnasium Straubing über, an dem ich im Frühjahr 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1965 bis September 1967 leistete ich Wehrdienst.

Im Herbst 1967 immatrikulierte ich mich als Student der Humanmedizin an der Universität München. Die Naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im Sommer 1968, die Ärztliche Vorprüfung im Frühjahr 1970 ab.

Im Sommer 1970 famulierte ich an der I. Medizinischen Klinik der Universität und nahm im Anschluß daran im Institut für Physiologische Chemie (Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. Theodor Bücher) unter der Betreuung von Herrn Dr. med. Werner Machleidt die Vorarbeiten zu meiner Dissertation auf. Von 1971 bis zum Medizinischen Staatsexamen, das ich im Sommer 1973 bestand, führte ich Untersuchungen zur Primärstruktur eines Proteaseninhibitors aus der Seeanemone, *Anemonia sulcata*, aus, die ich aus unfreien Stücken abbauen mußte. Unter der Anleitung von Herrn Dr. rer. nat. Elmar Wachter beteiligte ich mich in der Folge an der Ermittlung der Primärstruktur der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase aus dem Skelettmuskel des Kaninchens, dem Thema meiner Doktorarbeit.

Von Januar bis August 1977 absolvierte ich an der Chirurgischen Klinik und der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München den klinischen Teil meiner Medizinalassistentenzeit.

Ende 1977 nahm mich Herr Prof. Dr. rer. nat. Wolfram Zillig, Direktor am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, als wissenschaftlichen Assistenten in seine Arbeitsgruppe "Molekulare Biologie der Genwirkung" auf.

Im Juni 1980 wurde mir die ärztliche Approbation erteilt.

